



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga

Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología y Pediatría

Tesis doctoral

**"Reacciones alérgicas a antibióticos  
betalactámicos: identificación y  
caracterización de determinantes  
antigénicos y proteínas portadoras"**

Adriana Ariza Veguillas

Málaga, 2012







Hospital Regional Universitario  
**CARLOS HAYA**  
Servicio Andalúz de Salud  
**CONSEJERÍA DE SALUD**



Doña MARÍA JOSÉ TORRES JAÉN, Doctora en Medicina y Cirugía, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Alergología del Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga y Profesora Asociada del Departamento de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta ADRIANA ARIZA VEGUILLAS, con el título **"Reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos: identificación y caracterización de determinantes antigénicos y proteínas portadoras"** ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A. y en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. de Madrid bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 21 de Diciembre de 2012.

Fdo. Dra. María José Torres Jaén





Doña MARÍA DOLORES PÉREZ-SALA GOZALO, Doctora en Medicina y Cirugía,  
Investigadora Científica del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta ADRIANA ARIZA VEGUILLAS, con el título **"Reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos: identificación y caracterización de determinantes antigénicos y proteínas portadoras"** ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A. y en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. de Madrid bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Madrid a 21 de Diciembre de 2012.

Fdo. Dra. María Dolores Pérez-Sala Gozalo





Doña ELISA MARTÍN MONTAÑEZ, Doctora en Farmacia, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta ADRIANA ARIZA VEGUILLAS, con el título **"Reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos: identificación y caracterización de determinantes antigénicos y proteínas portadoras"** se ha realizado bajo mi tutela y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 21 de Diciembre de 2012.

Fdo. Dra. Elisa Martín Montañez





Hospital Regional Universitario  
**CARLOS HAYA**  
Servicio Andaluz de Salud  
**CONSEJERÍA DE SALUD**



Yo, ADRIANA ARIZA VEGUILLAS, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación cuyo título es **"Reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos: identificación y caracterización de determinantes antigénicos y proteínas portadoras"**, y que ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A. y en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. de Madrid, bajo la dirección de la Dra. María José Torres Jaén y la Dra. María Dolores Pérez-Sala Gozalo y bajo la tutela de la Dra. Elisa Martín Montañez.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 21 de Diciembre de 2012.

Fdo. Adriana Ariza Veguillas





**Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a los siguientes artículos científicos y comunicaciones a congresos:**

**Artículos científicos**

- Torres MJ, Ariza A, Mayorga C, Doña I, Blanca-López N, Rondón C, Blanca M. Clavulanic acid can be the component in amoxicillin-clavulanic acid responsible for immediate hypersensitivity reactions. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2):502-505.
- Torres MJ, Ariza A, Fernández J, Moreno E, Laguna JJ, Montañez MI, Ruiz-Sánchez AJ, Blanca M. Role of minor determinants of amoxicillin in the diagnosis of immediate allergic reactions to amoxicillin. Allergy. 2010 May;65(5):590-6.
- Ariza A, Garzon D, Ruiz-Abánades D, de los Ríos V, Vistoli G, Torres MJ, Carini M, Aldini G, Pérez-Sala D. Protein haptentation by amoxicillin: high resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. Journal of Proteomics. 2012 Dec 21;77:504-20.

**Comunicaciones a congresos**

- Ariza A, Torres MJ, Fernández J, Moreno E, Laguna J, Mayorga C, Pérez-Inestrosa E, Suau R, Blanca M, Rondón C. Minor determinants of amoxicillin in the evaluation of immediate allergic reactions to amoxicillin. XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 6-10 de Junio de 2009, Varsovia (Polonia).
- Ariza A, Mayorga C, Blanca-López N, Chaves P, Blanca M, Torres MJ. Reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por amoxicilina - ácido clavulánico. Simposio Internacional de Alergia a Medicamentos, SEAIC, 22-24 de Octubre de 2009, Logroño (España).
- Ariza A, Fernández J, Moreno E, Laguna J, Blanca M, Torres MJ. Determinantes menores de amoxicilina en la evaluación de reacciones alérgicas inmediatas a amoxicilina. Simposio Internacional de Alergia a Medicamentos, SEAIC, 22-24 de Octubre de 2009, Logroño (España).
- Torres MJ, Ariza A, Doña I, Gómez F, Rondón C, Blanca M. Clavulanic acid can be the responsible component of amoxicillin-clavulanic acid in immediate hypersensitivity reactions. Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 26 Febrero - 2 Marzo de 2010, Nueva Orleans (EEUU).
- Mayorga C, Torres MJ, Ariza A, Blanca-López N, Rondón C, Cañamero D, Doña I, Gómez F, Blanca M. Clavulanic acid can be the component in amoxicillin-clavulanic

acid responsible for immediate hypersensitivity reactions. XXIX Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 5-9 de Junio de 2010, Londres (Reino Unido).

- Ariza A, Mayorga C, Doña I, Gómez F, Pérez-Inestrosa E, Montañez MI, Rodríguez-Bada JL, Guerrero MA, Blanca M, Torres MJ. Different patterns of IgE recognition to amoxicillin in patients with immediate hypersensitivity reactions. Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 18-22 de Marzo de 2011, San Francisco (EEUU).

- Ariza A, Mayorga C, Pérez-Sala D, Aranda A, Montañez MI, Rodríguez-Bada JL, Blanca M, Torres MJ. Role of the protein binding in the IgE recognition to amoxicillin in patients with immediate hypersensitivity reactions. XXX Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 11-15 de Junio de 2011, Estambul (Turquía).

- Ariza A, Abánades DR, de Los Ríos V, Blanca M, Torres MJ, Pérez-Sala D. Protein haptenation by amoxicillin: immunological detection with monoclonal anti-amoxicillin antibodies and identification of candidate target proteins in human serum. Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 22-26 de Febrero de 2013, San Antonio (EEUU).

**La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las siguientes fuentes de financiación:**

- Proyecto de investigación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (PS09/01768). Respuesta IgE a antibióticos betalactámicos. Análisis de la contribución de diferentes estructuras químicas al reconocimiento por los anticuerpos e identificación de proteínas candidatas. Investigador principal: Dra. María José Torres Jaén.
- Proyecto de investigación de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0551). Nanoestructuras dendriméricas soportadas sobre superficies sólidas aplicadas al desarrollo de un test *in vitro* para el diagnóstico de hipersensibilidad inmediata a antibióticos betalactámicos. Investigador principal: Dr. Ezequiel Perez-Inestrosa.
- Proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (financiado parcialmente por “Plan E”) (SAF2009-11642). Modificaciones lipídicas de residuos de cisteína: repercusiones funcionales y potenciales aplicaciones en biomedicina. Investigador principal: Dra. María Dolores Pérez-Sala Gozalo.
- Proyecto de investigación de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0545-2010). Diseño de nanoestructuras sintéticas hapteno-portador para la detección de anticuerpos IgE en reacciones de hipersensibilidad a betalactámicos. Investigador principal: Dra. María José Torres Jaén.
- Proyecto de investigación de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia) (CTS 06603). Desarrollo de prototipos experimentales de conjugados hapteno-carrier para aplicación diagnóstica en las reacciones de hipersensibilidad a fármacos. Investigador principal: Dra. María José Torres Jaén.
- Red de Investigación de Reacciones Alérgicas a Alergenos y Fármacos (RIRAAF) del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (RETIC RD07/0064/0000 y RD RD07/0064/0007). Coordinador: Dr. Miguel Blanca Gómez.
- Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (FI08/00385).
- Ayuda de movilidad EU COST Action (European Cooperation in Science and Technology Action) (CM1001).



## *Agradecimientos*



*La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda y a la colaboración de muchas personas y éste es el momento para agradecer la dedicación, el apoyo y el cariño que me han mostrado durante todos estos años.*

*En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> José Torres y a la Dra. Dolores Pérez-Sala su trabajo como directoras de esta tesis doctoral y el tiempo y el esfuerzo que han dedicado al diseño experimental y a la elaboración de esta memoria. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por el apoyo que me habéis ofrecido durante estos años de formación. También quisiera dar las gracias a la Dra. Elisa Martín por su labor como tutora y por la ayuda que siempre ha estado dispuesta a ofrecerme.*

*Al Dr. Miguel Blanca por permitirme formar parte de su grupo de investigación y a la Dra. Lina Mayorga por guiarme en mis primeros pasos en el mundo de la investigación sobre la alergia a fármacos. Gracias a los dos por todo el trabajo previo realizado durante tantos años a partir del cual he podido elaborar esta tesis doctoral.*

*Al Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa y a su grupo de investigación por su valiosa colaboración en la obtención de estructuras y herramientas moleculares necesarias para el desarrollo del trabajo experimental que se detalla en esta memoria.*

*Ringrazio il professor Giancarlo Aldini e gli altri componenti del suo gruppo di ricerca per la loro collaborazione in questo lavoro. Grazie a Davide per tutto quello che mi ha insegnato sulla spettrometria di massa e per tutto il lavoro svolto, che ha contribuito alla realizzazione di questa tesi. Voglio anche ringraziare Federica, Alessandra, Cristina, Nerea, Roberta e Danilo perché grazie a loro tengo buoni ricordi dei giorni passati presso l'Università degli Studi di Milano.*

*Al personal médico y de enfermería de los Servicios de Alergología del Hospital Carlos Haya de Málaga, del Hospital de la Cruz Roja de Madrid, del Hospital de Salamanca y del Hospital de Elche por su labor en la evaluación, diagnóstico y obtención de muestras biológicas de los pacientes incluidos en los diferentes estudios. Y por supuesto gracias a todas aquellas personas que han participado como pacientes o controles en los diferentes estudios y sin las que no habría sido posible la realización de esta tesis doctoral.*

*Al personal de los Servicios de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas y del Centro Nacional de Biotecnología por su trabajo en la detección e identificación proteica mediante espectrometría de masas y gracias al personal del*

*Servicio de Microscopía del Centro de Investigaciones Biológicas por su ayuda en la obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia.*

*A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga, sin los que todos estos años de trabajo no habrían sido lo mismo. Somos muchos los compañeros que trabajamos juntos en este laboratorio y no puedo mencionarlos a todos, pero me gustaría que supierais que cada uno de vosotros ha contribuido de alguna manera a la elaboración de esta tesis doctoral o ha estado presente en algún momento importante. Quisiera dar las gracias de un modo especial a Pepe por toda su ayuda desde mi primer día en el laboratorio, a Maribel por todo el trabajo realizado necesario para finalizar esta tesis doctoral y por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas, a Ana por todas las horas de trabajo en el laboratorio compartidas, a Raquel y Lidia por ayudarme siempre que lo he necesitado, y a M<sup>a</sup> Carmen, M<sup>a</sup> José y Pedro por darme ánimos en los numerosos momentos de bloqueo delante del ordenador en los que pensaba que nunca terminaría de escribir esta memoria. También quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que sin pertenecer a mi grupo de investigación han sido muy importantes para mí durante estos años, así que Caro, Eleha, Carlos, Juan Haro, Tati y Sara muchas gracias por todos los buenos momentos compartidos.*

*A mis compañeros de laboratorio en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, gracias a Dani por su gran ayuda y su compañía durante mis últimos meses de trabajo y gracias a Clara, Bea Díez, M<sup>a</sup> Jesús, Ruth y Bea Garzón por hacerme sentir una más del grupo desde que comencé allí mi larga estancia predoctoral.*

*A mis amigas de la facultad Patri, Mar, Pilar y Caro. Sin vosotras los años de universidad no habrían estado llenos de momentos para recordar y las incontables horas que pasábamos en la facultad me habrían parecido mucho más largas. Muchas gracias por seguir a mi lado casi seis años después de haber salido de la universidad.*

*Por último, mi agradecimiento más especial es para toda mi familia por el apoyo y el cariño que siempre he recibido de ellos. Gracias a todos vosotros por conseguir que los buenos momentos sean aún mejores y que los malos momentos no sean tan dolorosos. Gracias a mis padres por confiar en mí, por hacerme sentir que siempre puedo contar con ellos y por ayudarme a superar los momentos difíciles. Gracias a mi hermano por lograr arrancarme siempre una sonrisa, por no tener miedo a nada y por mostrarme que es posible alcanzar aquello que parecía imposible, sólo hay que proponérselo.*



*A mis padres*  
*A mi hermano*



<b>ACA</b>	Ácido aminocefalosporánico
<b>ACF</b>	Administración controlada de fármaco
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>APA</b>	Ácido aminopenicilánico
<b>APO</b>	Ampiciloilo
<b>AX</b>	Amoxicilina
<b>AX-CLV</b>	Amoxicilina-Ácido clavulánico
<b>AXO</b>	Amoxiciloilo
<b>BA</b>	Butilamina
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico (del inglés "bicinchoninic acid")
<b>BL</b>	Betalactámico
<b>BP</b>	Bencilpenicilina
<b>BPO</b>	Bencilpeniciloilo
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina (del inglés "bovine serum albumin")
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión (del inglés "collision induced dissociation")
<b>CLV</b>	Ácido clavulánico
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>CPH</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>Cys-HSA</b>	Albúmina sérica humana cisteinilada
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol (del inglés "4',6-diamidino-2-phenylindole")
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DHAP</b>	Dihidroxiacetofenona (del inglés "dihydroxyacetophenone")
<b>DIC</b>	Contraste de interferencia diferencial (del inglés "differential-interference contrast")
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés "Dulbecco's modified Eagle medium")
<b>DN</b>	Dendrímero
<b>DRESS</b>	Exantema cutáneo por fármacos con eosinofilia y síntomas sistémicos (del inglés "drug rash with eosinophilia and systemic symptoms")
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EAACI</b>	Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (del inglés "European Academy of Allergy and Clinical Immunology")
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia mejorada (del inglés "enhanced chemiluminescence")
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés "ethylenediaminetetraacetic acid")

<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetraacético (del inglés “ethyleneglycoltetraacetic acid”)
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción acoplado a actividad enzimática (del inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”)
<b>ENDA</b>	Red Europea de Alergia a Fármacos (del inglés “European Network of Drug Allergy”)
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray (del inglés “electrospray ionization”)
<b>Fab</b>	Fragmento de unión a antígeno (del inglés “fragment antigen binding”)
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal (del inglés “fetal bovine serum”)
<b>Fc</b>	Fragmento cristizable
<b>FcεR</b>	Receptor de la fracción cristizable de cadenas pesadas ε
<b>FcεRI</b>	Receptor de la fracción cristizable de cadenas pesadas ε de alta afinidad
<b>FcεRII</b>	Receptor de la fracción cristizable de cadenas pesadas ε de baja afinidad
<b>FEIA</b>	Fluoroinmunoensayo enzimático (del inglés “fluorometric enzyme immunoassay”)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés “fluorescein isothiocyanate”)
<b>fMLP</b>	N-formil-Met-Leu-Phe
<b>G4</b>	Generación 4
<b>Glc-HSA</b>	Albúmina sérica humana glicada
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (del inglés “granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”)
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HCD</b>	Disociación por colisión de alta energía (del inglés “higher-energy collisional dissociation”)
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano (del inglés “human leukocyte antigen”)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés “high-performance liquid chromatography”)
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano (del inglés “horseradish peroxidase”)
<b>HSA</b>	Albúmina sérica humana (del inglés “human serum albumin”)
<b>IC</b>	Intracutánea
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular (del inglés “intercellular adhesion molecule”)
<b>ID</b>	Intradérmica
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IE</b>	Índice de estimulación
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina

<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación
<b>LC</b>	Cromatografía líquida (del inglés “liquid chromatography”)
<b>LTQ</b>	Cuadrupolo con trampa lineal (del inglés “linear trap quadrupole”)
<b>m/z</b>	Cociente de masa/carga
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción e ionización mediante láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (del inglés “matrix assisted laser desorption ionization-time of flight”)
<b>MDM</b>	Mezcla de determinantes menores
<b>MS</b>	Espectrometría de masas (del inglés “mass spectrometry”)
<b>MIP</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos (del inglés “macrophage inflammatory protein”)
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés “National Center for Biotechnology Information”)
<b>NK</b>	Natural killer
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés “polyacrilamide gel electrophoresis”)
<b>p-i</b>	Interacción farmacológica (del inglés “pharmacologic interaction”)
<b>PAMAM</b>	Poli-aminoamida
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (del inglés “phosphate buffered saline”)
<b>PC</b>	Prueba cutánea
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas (del inglés “protein data bank”)
<b>PE</b>	Ficoeritrina (del inglés “phycoerythrin”)
<b>PI3-K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés “phosphatidylinositol 3-kinase”)
<b>PLL</b>	Poli-L-lisina
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PPL</b>	Peniciloil-polilisina
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno (del inglés “polyvinylidene difluoride”)
<b>RAST</b>	Prueba radioalergoabsorbente (del inglés “radioallergosorbent test”)
<b>RcT</b>	Receptor de células T
<b>RDC</b>	Regiones determinantes de complementariedad
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo (del inglés “radioimmunoassay”)
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico (del inglés “sodium dodecyl sulfate”)
<b>SI</b>	Sistema inmunológico

<b>RAF</b>	Reacciones adversas a fármacos
<b>RAFBI</b>	Reacciones adversas a fármacos con base inmunológica
<b>TAB</b>	Test de activación de basófilos
<b>TBS</b>	Tampón tris salino (del inglés “tris-buffered saline”)
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético (del inglés “trichloroacetic acid”)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético (del inglés “trifluoroacetic acid”)
<b>TFE</b>	Trifluoroetanol
<b>Th</b>	Células T colaboradoras (del inglés “helper T cells”)
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral (del inglés “tumor necrosis factor”)
<b>UI</b>	Unidad internacional
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WTM</b>	Wortmanina

## Índice

---





<b>I. Introducción.....</b>	<b>31</b>
1. Reacciones adversas a fármacos.....	33
1.1. Definición.....	33
1.2. Epidemiología y prevalencia .....	33
1.3. Clasificación .....	34
1.3.1. Tipo A: Predecibles.....	34
1.3.2. Tipo B: Impredecibles .....	34
2. Reacciones adversas a fármacos con base inmunológica .....	35
2.1. Definición .....	35
2.2. Epidemiología y prevalencia .....	35
2.3. Factores de riesgo .....	37
2.4. Clasificación .....	39
2.4.1. Clasificación inmunológica.....	39
2.4.2. Clasificación clínica .....	44
2.5. Conceptos y procesos inmunológicos relacionados con las reacciones alérgicas inmediatas .....	45
2.5.1. Inmunoglobulina E .....	45
2.5.2. Mecanismos inmunológicos implicados en las reacciones alérgicas inmediatas .....	48
3. Fármacos como haptenos.....	51
3.1. Hipótesis del hapteno .....	51
3.1.1. Mecanismos de haptениización.....	54
3.1.2. Modelos de reconocimiento de haptenos por células T específicas.....	55
3.2. Concepto de la interacción farmacológica con receptores inmunológicos (“p-i concept”).....	57
3.3. Teoría del peligro e importancia de las “señales de peligro” en el contexto de la hipótesis del hapteno .....	58
4. Reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos betalactámicos.....	60
4.1. Aspectos clínicos .....	60
4.1.1. Características generales .....	60
4.1.2. Epidemiología y prevalencia .....	62
4.1.3. Manifestaciones clínicas .....	63
4.2. Aspectos químicos de los antibióticos betalactámicos .....	64
4.2.1. Definición .....	64
4.2.2. Clasificación y estructura química.....	64
4.2.3. Antibióticos betalactámicos como haptenos.....	71
4.2.4. Penicilinas como haptenos .....	72
4.3. Métodos diagnósticos.....	82
4.3.1. Pruebas cutáneas.....	84

4.3.2. Pruebas <i>in vitro</i> .....	86
4.3.3. Administración controlada de fármaco.....	87
4.3.4. Comparación entre diferentes métodos diagnósticos .....	88
4.3.5. Evolución a lo largo del tiempo .....	89
<b>II. Justificación e hipótesis</b> .....	91
<b>III. Objetivos</b> .....	97
<b>IV. Material y métodos</b> .....	101
1. Identificación de determinantes antigénicos de antibióticos betalactámicos reconocidos por anticuerpos IgE específicos.....	103
1.1. Ámbito de estudio .....	103
1.2. Selección de pacientes y controles.....	104
1.3. Obtención de determinantes menores de AX .....	106
1.4. Obtención de conjugados de AX con moléculas portadoras .....	107
1.5. Pruebas <i>in vivo</i> .....	108
1.6. Pruebas <i>in vitro</i> .....	111
1.7. Estudios estadísticos .....	118
2. Identificación de proteínas séricas y celulares modificadas por AX y caracterización de aductos HSA-AX generados <i>in vitro</i> .....	118
2.1. Extracción de HSA desde suero humano .....	118
2.2. Modificación <i>in vitro</i> de proteínas séricas humanas por AX .....	120
2.3. Modificación de proteínas celulares por AX.....	121
2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot .....	122
2.5. Espectrometría de masas .....	124
2.6. Microscopía de fluorescencia .....	132
3. Soluciones, tampones y material fungible.....	133
3.1. Soluciones y tampones.....	133
3.2. Material fungible .....	134
<b>V. Resultados</b> .....	135
1. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX.....	137
1.1. Obtención de determinantes menores de la AX .....	137
1.2. Selección y clasificación de pacientes. Pruebas <i>in vivo</i> . .....	138
1.3. Pruebas <i>in vitro</i> .....	143
1.3.1. Test de activación de basófilos.....	143
1.3.2. Inhibición del RAST .....	144
2. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV .....	145
2.1. Selección y clasificación de pacientes. Pruebas <i>in vivo</i> . .....	146

2.2. Estudios comparativos entre grupos de pacientes .....	151
2.3. Test de activación de basófilos .....	151
2.4. Confirmación de la respuesta alérgica frente al CLV como una reacción mediada por IgE .....	154
2.4.1. Inhibición del test de activación de basófilos con wortmanina .....	154
2.4.2. Negativización del test de activación de basófilos a lo largo del tiempo.....	155
3. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX .....	156
3.1. Selección de pacientes.....	156
3.2. Inhibición del RAST .....	156
4. Desarrollo de abordajes para la detección de proteínas séricas y celulares modificadas por AX.....	160
4.1. Detección inmunológica de HSA modificada por AX mediante Western blot con varios anticuerpos anti-BL .....	160
4.2. Empleo de AX biotinilada para la modificación de proteínas séricas .....	162
4.2.1. Detección de HSA modificada por AX biotinilada mediante Western blot.....	162
4.2.2. Reconocimiento de AX biotinilada por anticuerpos IgE específicos de pacientes con una reacción alérgica inmediata a AX.....	164
5. Identificación de dianas séricas de la AX .....	165
5.1. Detección e identificación de proteínas diana de la AX en suero humano... ..	165
5.2. Detección inmunológica de la modificación de proteínas séricas por AX en presencia de agentes oxidantes.....	168
5.2.1. Efecto del GSSG sobre la modificación <i>in vitro</i> de HSA por AX .....	168
5.2.2. Efecto del GSSG sobre la modificación <i>in vitro</i> de proteínas séricas por AX .....	170
5.3. Modificación de proteínas séricas por AX en ensayos de inhibición del RAST .....	171
6. Caracterización de la modificación <i>in vitro</i> de HSA por AX mediante espectrometría de masas.....	172
6.1. Caracterización de aductos HSA-AX generados <i>in vitro</i> mediante MALDI-TOF.....	173
6.1.1. Detección de aductos HSA-AX y estimación de la estequiometría de la modificación.....	173
6.1.2. Identificación de los sitios de modificación de la HSA por AX .....	175
6.2. Caracterización de aductos HSA-AX generados <i>in vitro</i> mediante LTQ Orbitrap XL.....	176

6.2.1. Detección de aductos HSA-AX y estimación de la estequiometría de la modificación .....	176
6.2.2. Identificación de los sitios de modificación de la HSA por AX en muestras de HSA purificada .....	178
6.2.3. Identificación de los sitios de modificación de la HSA presente en suero humano por AX.....	180
7. Identificación de dianas celulares de la AX.....	181
7.1. Detección inmunológica de proteínas celulares modificadas por AX mediante Western blot .....	181
7.2. Detección, identificación y visualización de proteínas celulares modificadas por AX biotinilada.....	182
7.2.1. Detección e identificación de proteínas celulares modificadas por AX biotinilada mediante Western blot y espectrometría de masas .....	182
7.2.2. Visualización de la distribución celular de proteínas modificadas por AX biotinilada mediante microscopía de fluorescencia.....	185
<b>VI. Discusión.....</b>	<b>187</b>
1. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX.....	189
2. Estudio de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por la combinación AX-CLV .....	191
3. Estudio del papel de proteínas séricas y celulares en la formación de los determinantes antigénicos reconocidos por el SI .....	196
3.1. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX.....	198
3.2. Obtención de herramientas para la detección de proteínas séricas y celulares modificadas por AX.....	200
3.3. Identificación de dianas séricas y caracterización de la modificación <i>in vitro</i> de HSA por AX .....	202
<b>VII. Conclusiones.....</b>	<b>209</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>213</b>

# **I. Introducción**

---



## **1. Reacciones adversas a fármacos**

### **1.1. Definición**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las reacciones adversas a fármacos (RAF) se definen como “todas aquellas respuestas nocivas y no intencionadas, o cualquier otro efecto perjudicial no deseado que ocurre tras la administración de una dosis habitualmente utilizada del fármaco en la especie humana para la profilaxis, diagnóstico y tratamiento de una enfermedad o para la modificación de una función biológica” (*World Health Organization, 1972*).

La definición de la OMS resulta incompleta e imprecisa para algunos autores que proponen nuevas definiciones en las que se incluyen otros aspectos como la predicción del riesgo de una futura administración del fármaco o sucesos adversos producidos por errores en la administración o el incumplimiento del tratamiento (Edwards y Aronson, 2000; Ross, 2001). El hecho de que no exista una única definición de las RAF representa la primera dificultad para el estudio y el manejo de este tipo de reacciones.

### **1.2. Epidemiología y prevalencia**

Las RAF se consideran un importante problema de salud pública porque son una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Riedl y Casillas, 2003). Es difícil precisar los valores exactos de prevalencia de las RAF y se asume que están subestimados, fundamentalmente porque muchas de las reacciones, sobre todo si no son muy graves, no se recogen en informes médicos o no trascienden. Los datos de los que se dispone indican que las RAF afectan al 10-20% de los pacientes hospitalizados y a más del 7% de la población general, y representan el 5% de las admisiones hospitalarias (Lazarou *et al.*, 1998; Pouyanne *et al.*, 2000).

Aunque se han realizado diversos estudios epidemiológicos, hay que tener en cuenta la disparidad en la realización de los mismos y la escasez de datos en muchos de ellos, así como la dificultad de realizar estudios comparativos entre distintas áreas geográficas. En los estudios realizados para la población europea se ha observado que entre el 3,3% y el 7,1% de las hospitalizaciones son debidas a RAF (Fattinger *et al.*, 2000; Olivier *et al.*, 2002; Pirmohamed *et al.*, 2004), y concretamente en España se estima que este porcentaje oscila entre el 2% y el 7% (Puche y Luna, 2006).

### 1.3. Clasificación

Las RAF pueden clasificarse en función de sus características clínicas, farmacológicas y químicas. Existen numerosas clasificaciones (Edwards y Aronson, 2000; Meyboom *et al.*, 2000; Ross, 2001; Nebeker *et al.*, 2004), pero la más utilizada es la clasificación farmacológica clásica propuesta por Rawlins y Thompson (Rawlins y Thompson, 1977) según la cual las RAF se dividen en reacciones predecibles e impredecibles.

#### 1.3.1. Tipo A: Predecibles

Son las más frecuentes ya que representan alrededor del 80% del total de las RAF. Están relacionadas con la acción farmacológica del medicamento y dependen de la dosis administrada. En este grupo se incluyen reacciones debidas a una sobredosificación o a la toxicidad del fármaco, a efectos secundarios del mismo o a interacciones con otros medicamentos (Bernstein, 1995).

#### 1.3.2. Tipo B: Impredecibles

Se generan por mecanismos no relacionados con la acción farmacológica del medicamento, son independientes de la dosis administrada y representan entre el 10-15% del total de las RAF. Las reacciones impredecibles se pueden clasificar a su vez en función de los mecanismos que las producen en los siguientes subtipos (Bernstein, 1995; deShazo y Kemp, 1997):

- a) Intolerancia farmacológica: Respuesta producida por un efecto no deseado del fármaco a dosis terapéuticas o subterapéuticas.
- b) Reacciones idiosincráticas: Respuestas anómalas no relacionadas con la acción farmacológica del medicamento y sin base inmunológica demostrable para las que existe una especial susceptibilidad individual que puede ser entre otros de carácter metabólico.
- c) Reacciones pseudoalérgicas: Respuestas adversas que simulan clínicamente una reacción alérgica pero en las que no hay una base inmunológica demostrable.
- d) Reacciones adversas a fármacos con base inmunológica o reacciones alérgicas: Reacciones adversas que son producidas por mecanismos inmunológicos definidos.



## **2. Reacciones adversas a fármacos con base inmunológica**

### **2.1. Definición**

Las reacciones adversas a fármacos con base inmunológica (RAFBI) o reacciones alérgicas a fármacos, como se ha mencionado anteriormente, son reacciones de hipersensibilidad mediadas por mecanismos inmunológicos conocidos. Las reacciones alérgicas a fármacos se producen en situaciones en las que el sistema inmunológico (SI) reconoce específicamente a un fármaco y desencadena una respuesta efectora frente al mismo en lugar de generar una respuesta de tolerancia, lo que ocasiona un daño potencialmente grave en el organismo. Una característica muy importante de estas reacciones es que requieren una exposición previa al fármaco o a otra molécula químicamente relacionada para estimular al SI y que se conoce como fase de sensibilización.

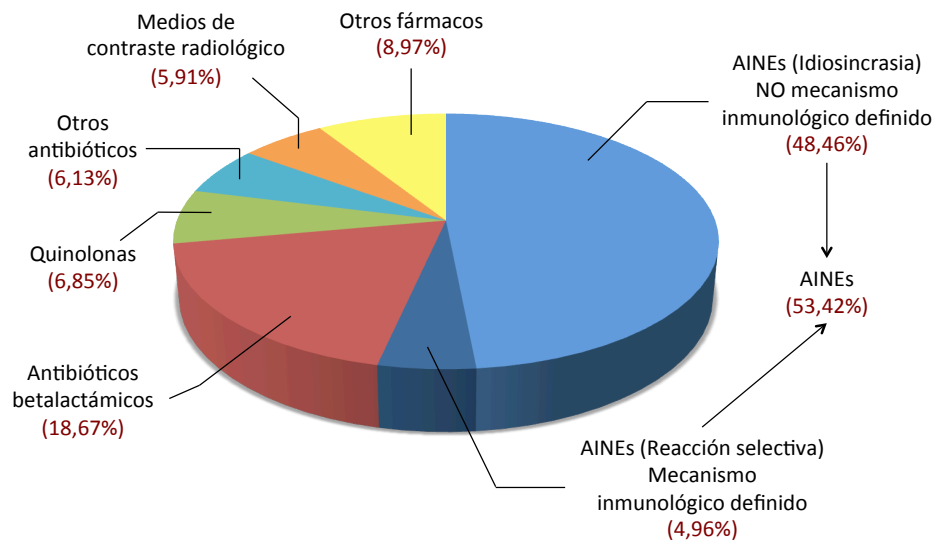
Las RAFBI pueden producirse con dosis inferiores a las requeridas para conseguir el efecto farmacológico del medicamento (Gruchalla, 2000) y aparecen en un intervalo de tiempo muy variable tras su administración, que puede extenderse desde un período inferior a 1 hora hasta 24 horas o incluso varios días. Este tipo de reacciones producen un número bien delimitado y definido de patologías que son biológicamente compatibles con una reacción inmunológica y suelen desaparecer tras la retirada del fármaco, aunque pueden existir excepciones en las que se prolonguen los efectos patológicos (Kearns *et al.*, 1994; Meekins *et al.*, 1994).

### **2.2. Epidemiología y prevalencia**

En la actualidad se desconoce la prevalencia real de las RAFBI (Padilla Serrato *et al.*, 2006), y los datos de morbilidad, mortalidad y de los costes económicos asociados a las mismas a menudo están subestimados. Se han realizado pocos estudios sistemáticos que describan tanto la incidencia como la prevalencia de las RAFBI en la población general y la mayoría de los datos proceden de pacientes hospitalizados y de servicios de urgencias, por tanto son cifras simplemente orientativas. A partir de estos estudios se deduce que las RAFBI representan entre el 6-10% de todas las RAF, pero estos valores pueden variar de unos estudios a otros dependiendo de los métodos empleados para confirmar el diagnóstico (Torres *et al.*, 2003; Demoly y Hillaire-Buys, 2004; Romano y Demoly, 2007; Szczeklik *et al.*, 2009).

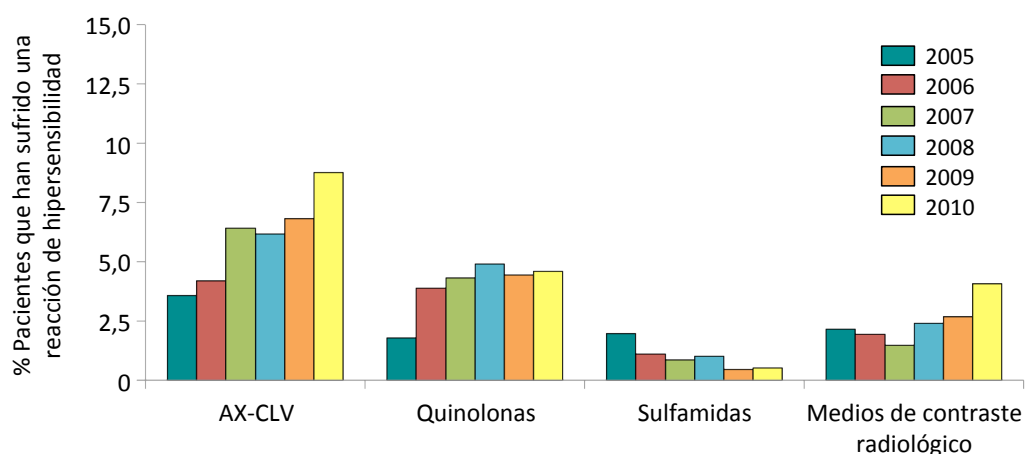
En España los fármacos que se consumen con mayor frecuencia son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) seguidos de los antibióticos betalactámicos

(BLs). Debido al elevado número de personas que están expuestas a los AINEs, estos fármacos son los que inducen con mayor frecuencia reacciones de hipersensibilidad, pero según un estudio realizado por Doña *et al.* (Doña *et al.*, 2012) sólo la décima parte de estas reacciones están asociadas a un mecanismo inmunológico definido, siendo los antibióticos BLs los responsables del mayor número de reacciones alérgicas a fármacos mediadas por un mecanismo inmunológico conocido, seguidos por las quinolonas y por otros antibióticos (Figura 1).



**Figura 1:** Porcentaje de reacciones de hipersensibilidad a fármacos durante el año 2010 según un estudio realizado por Doña *et al.* (Doña *et al.*, 2012).

Los valores de las frecuencias de las reacciones alérgicas asociadas a cada fármaco varían a lo largo del tiempo en función de los cambios que se producen en los hábitos de prescripción médica. En el mismo estudio realizado por Doña *et al.* durante los años 2005 y 2010 (Doña *et al.*, 2012), se observó que la frecuencia de las reacciones alérgicas a antibióticos BLs continuaba con la misma tendencia descrita desde los años 80 (Blanca, 1995), con una disminución progresiva de las reacciones producidas por bencilpenicilina (BP) y un incremento de las inducidas por amoxicilina (AX); además hay que destacar un incremento significativo en las reacciones de urticaria y anafilaxia provocadas por nuevos fármacos como la combinación amoxicilina-ácido clavulánico (AX-CLV) cuyo consumo ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años (en España se consumieron 20 millones de unidades en 2008) y las quinolonas (Blanca-Lopez *et al.*, 2011). También se debe mencionar la disminución de las reacciones alérgicas asociadas a las sulfamidas y el incremento de las producidas por otros fármacos no antibióticos como son los medios de contraste radiológico (Figura 2).



**Figura 2:** Variación del porcentaje de las reacciones de hipersensibilidad a diferentes fármacos durante los años 2005-2010 con respecto al total de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a fármacos según un estudio realizado por Doña *et al.* (Doña *et al.*, 2012).

### 2.3. Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo que favorecen el desarrollo de las RAFBI, los cuales están relacionados con la naturaleza del fármaco que induce la respuesta inmunológica y con las características del propio paciente.

#### a) Asociados con el fármaco

- **Peso molecular y propiedades químicas:** Son los dos factores más importantes, de modo que los fármacos de mayor peso molecular y con una gran complejidad estructural tienen una mayor probabilidad de ser inmunogénicos al actuar como antígenos complejos capaces de inducir una reacción de hipersensibilidad, como ocurre con el suero heterólogo, la estreptoquina y la insulina (Riedl y Casillas, 2003). Sin embargo, la mayoría de los fármacos tienen un peso molecular inferior a 1000 Da y actúan como haptenos. Siguiendo el modelo de la hipótesis del hapteno (Landsteiner y Jacobs, 1935), que detallaremos en apartados posteriores, la reactividad química del propio fármaco y de sus metabolitos es un factor muy importante que determina su capacidad de unirse a macromoléculas portadoras con las que forman conjugados estables que pueden ser reconocidos por el SI. Atendiendo al modelo de interacción farmacológica (p-i concept) (Pichler, 2002), que también explicaremos posteriormente, los factores que determinan el potencial estimulador del fármaco son su configuración estérica y su capacidad de reaccionar con los receptores de las células T (RcT).

- Vía de administración: Los fármacos administrados por vía tópica, intramuscular e intravenosa pueden causar con mayor probabilidad una reacción de hipersensibilidad. Estos efectos son debidos a la eficiencia de penetración del antígeno en la piel y a la alta concentración de fármaco circulante que se alcanza con rapidez en la terapia intravenosa. En el caso de los fármacos orales, es menos probable que se produzca una reacción de hipersensibilidad (Adkinson, 1984; Riedl y Casillas, 2003).

b) Asociados con el paciente

- Edad: La mayoría de las reacciones alérgicas se producen durante la juventud y la etapa media de la vida de los pacientes (20-50 años) (Barranco y Lopez-Serrano, 1998). Durante la infancia, las RAFBI son poco frecuentes debido a varios factores tales como la inmadurez del SI, una exposición menos frecuente a los fármacos y el empleo de dosis menores a las administradas en adultos (Boguniewicz y Leung, 1995; Demoly y Bousquet, 2001). En personas mayores de 65 años la frecuencia también es menor a pesar del alto consumo de fármacos propio de esta franja de edad, y este hecho se atribuye a una involución del SI (Girard *et al.*, 1976).

- Sexo: Las mujeres son más susceptibles a desarrollar una RAFBI que los hombres. En estudios epidemiológicos se ha observado que el 65-70% de las personas que sufren una RAFBI son mujeres (Asero, 1998, Barranco y Lopez-Serrano, 1998), sin embargo no se han encontrado diferencias significativas en el tipo de manifestaciones clínicas y en la tasa de mortalidad con respecto al sexo (Thong *et al.*, 2003).

- Factores genéticos: Aunque no se ha demostrado una relación genética clara, existen datos que muestran una asociación entre varias reacciones de hipersensibilidad graves y ciertos haplotipos del antígeno leucocitario humano (HLA) (Mallal *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2005). Además, se ha descrito la existencia de una predisposición familiar a desarrollar reacciones alérgicas, de modo que los hijos de padres alérgicos a un antibiótico tienen un riesgo relativo de padecer una reacción alérgica a antibióticos 15 veces superior al de niños sin esos antecedentes (Attaway y Strunk, 1989; Pirmohamed *et al.*, 2004).

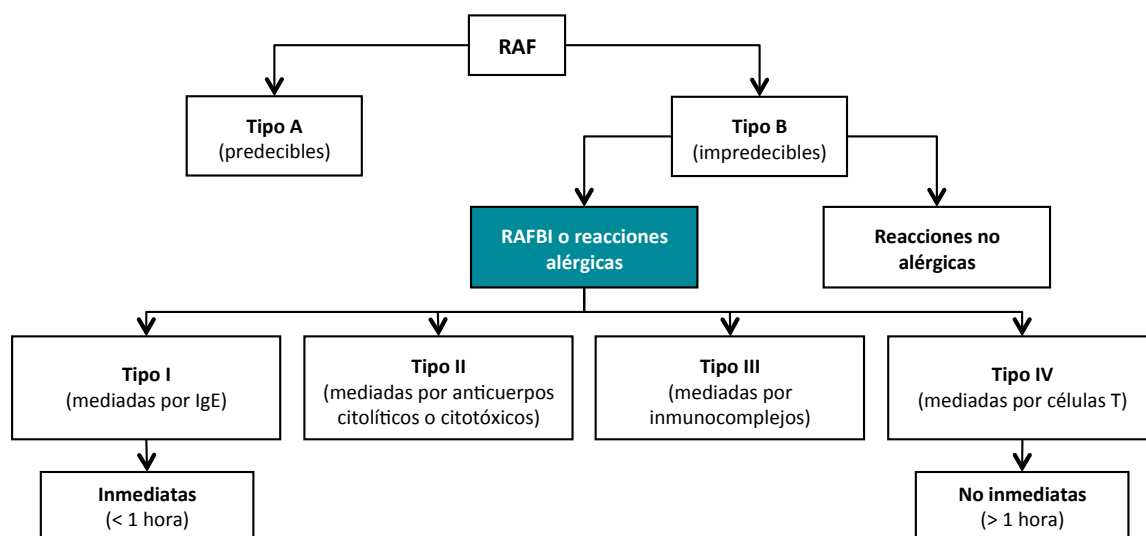
- Atopia: Las personas atópicas no parecen estar predispuestas a desarrollar una reacción alérgica a fármacos, pero sus reacciones pueden ser más graves (Astarita *et al.*, 1988; Haddi *et al.*, 1990). Sin embargo, el papel que la atopia puede desempeñar en la aparición de reacciones alérgicas a ciertos fármacos, tales

como los AINEs sigue siendo un aspecto controvertido (Sanchez-Borges y Capriles-Hulett, 2000; Demoly y Bousquet, 2001).

- **Enfermedades concomitantes:** Se ha demostrado que la existencia previa de determinadas enfermedades e infecciones eleva el riesgo de desarrollar una RAFBI, como ocurre con infecciones virales tales como la mononucleosis infecciosa, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Bayard *et al.*, 1992) y el herpes (Barranco y Lopez-Serrano, 1998), además de otras enfermedades como el asma (Lang *et al.*, 1991) y el lupus eritematoso sistémico (Petri y Allbritton, 1992). También se ha observado que la existencia de determinadas infecciones virales puede provocar un aumento en la duración y en la gravedad de los síntomas de algunas manifestaciones clínicas (Aihara *et al.*, 2003; Kano *et al.*, 2004).

## 2.4. Clasificación

Las RAFBI se pueden clasificar en función de criterios inmunológicos y clínicos tal y como detallamos en los próximos apartados (Figura 3).



**Figura 3:** Clasificación inmunológica y clínica de las RAFBI.

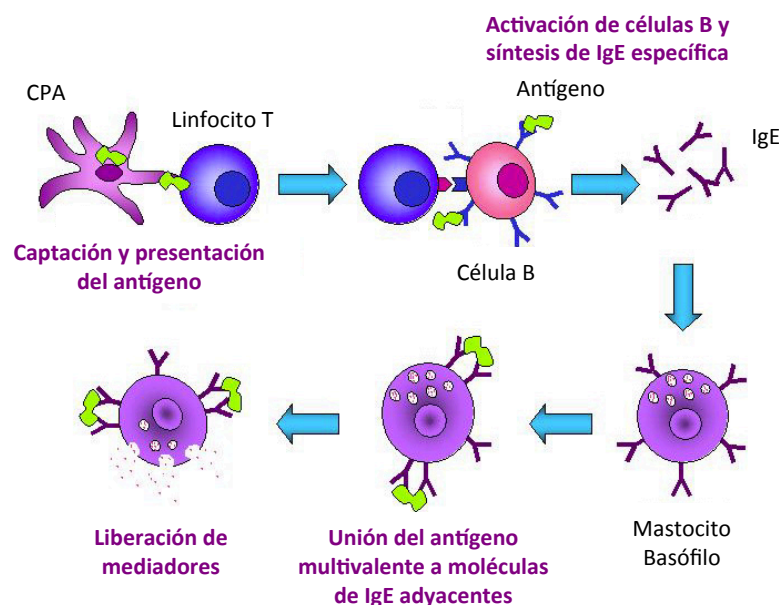
### 2.4.1. Clasificación inmunológica

Durante muchos años el sistema de clasificación de Gell y Coombs (Gell y Coombs, 1963) ha sido ampliamente aceptado como guía para la comprensión de las complejas reacciones inmunológicas. Esta clasificación establece cuatro tipos de reacciones alérgicas en función del mecanismo efector que las desencadena. Las reacciones alérgicas a fármacos se pueden producir por cualquiera de los cuatro tipos de mecanismos descritos, aunque las más frecuentes son las mediadas por IgE (reacciones Tipo I) o por células T (reacciones Tipo IV). A continuación se detallan los

cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad descritos en la clasificación original de Gell y Coombs:

a) Reacciones Tipo I o de hipersensibilidad inmediata, mediadas por IgE

Este tipo de reacciones están mediadas por anticuerpos IgE específicos unidos a la superficie de mastocitos tisulares y basófilos circulantes. En una fase previa de sensibilización, el antígeno es captado por las células presentadoras de antígenos (CPA) y presentado a los linfocitos T. Estos linfocitos T interactúan con las células B y a través de moléculas coestimuladoras y de la producción de IL-4 se induce su proliferación y la síntesis de anticuerpos IgE específicos. Los anticuerpos IgE específicos son secretados al torrente sanguíneo y se fijan a través de su región constante a los receptores de alta afinidad (FcεRI) existentes en la superficie de los mastocitos y de los basófilos. Cuando se produce una nueva entrada del antígeno, éste se une de forma simultánea a dos o más moléculas de IgE adyacentes en la superficie de los mastocitos o de los basófilos (de Weck, 1983a) y se desencadena una cascada enzimática que induce la degranulación de estas células con la consiguiente liberación de mediadores preformados (histamina) y la síntesis de otros mediadores (leucotrienos, citoquinas) (Figura 4). Estos mediadores son los responsables de las manifestaciones clínicas asociadas a este tipo de reacciones y sus principales efectos son la vasodilatación y la contracción del músculo liso, que ocurren con gran rapidez después de la exposición al antígeno (reacción inmediata) y una respuesta retardada que provoca principalmente inflamación.

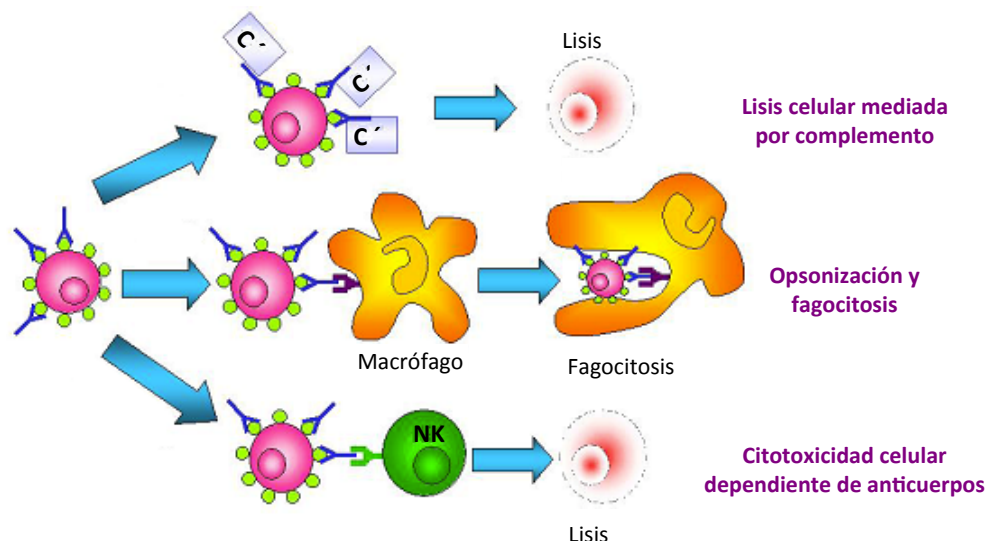


**Figura 4:** Reacciones de hipersensibilidad inmediata Tipo I, mediadas por IgE.

Los síntomas de las reacciones inmediatas pueden localizarse en la piel (urticaria), vías respiratorias (rinitis, asma bronquial) o tubo digestivo (vómitos, dolor abdominal y diarrea), o bien ser generalizados como en el choque anafiláctico (prurito, urticaria, hipotensión, angioedema y broncoespasmo), pudiendo causar incluso la muerte del paciente.

b) Reacciones Tipo II, mediadas por anticuerpos citolíticos o citotóxicos

Estas reacciones inmunológicas se caracterizan por la existencia de anticuerpos IgG e IgM (y en menor medida IgA) dirigidos contra antígenos de la superficie celular de eritrocitos, neutrófilos, plaquetas y células epiteliales de glándulas y mucosas o contra antígenos tisulares. En este tipo de reacciones los antígenos pueden ser antígenos naturales de la superficie celular, antígenos modificados de la superficie celular o haptenos unidos a la superficie celular. Los anticuerpos circulantes IgG e IgM (y en menor grado IgA) se unen a los antígenos de superficie celular para los que son específicos y guían a los elementos no específicos del SI para conseguir la eliminación de estas células por lisis celular (mediada o no por el complemento) o por opsonización y fagocitosis (Figura 5). En el caso de las reacciones a fármacos, las células que se ven afectadas con mayor frecuencia son las del torrente sanguíneo, hígado y riñón.

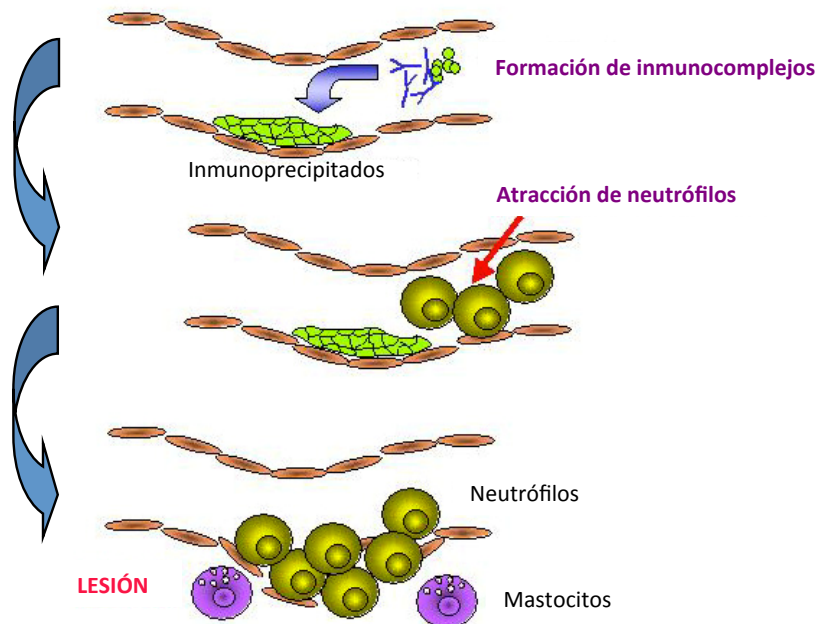


**Figura 5:** Reacciones Tipo II, mediadas por anticuerpos citolíticos o citotóxicos.

Las manifestaciones clínicas más habituales son la anemia hemolítica inmune, la trombopenia o la granulocitopenia. Estos tipos de reacciones son más frecuentes en pacientes que reciben tratamientos prolongados y con altas dosis del fármaco.

c) Reacciones Tipo III, mediadas por inmunocomplejos

En estas reacciones participan anticuerpos IgG e IgM, la vía del complemento y los neutrófilos como respuesta a ciertos antígenos, provocando un daño inmunológico. Se caracterizan por la formación de inmunocomplejos entre los antígenos y anticuerpos solubles (IgM o IgG) que generan inmunoprecipitados que se depositan en tejidos como el endotelio de pequeños vasos sanguíneos o la membrana basal glomerular. La activación del complemento provoca la liberación de quimioatrayentes que desencadenan una compleja serie de respuestas inflamatorias que se agravan por una fagocitosis fallida y la liberación de especies reactivas de oxígeno (Figura 6).



**Figura 6:** Reacciones Tipo III, mediadas por inmunocomplejos.

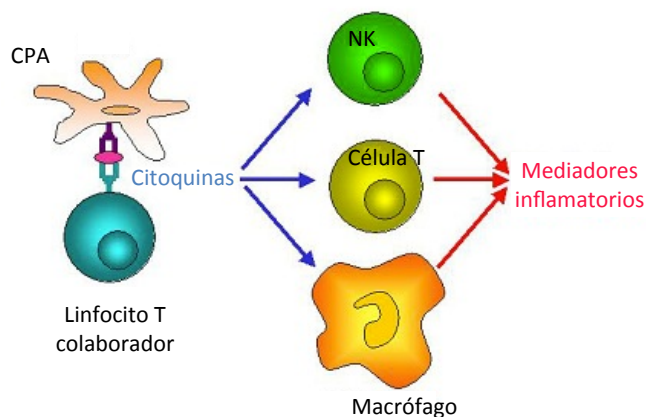
Los síntomas clínicos desarrollados dependen del órgano diana en el que se depositen los inmunocomplejos, que fundamentalmente se observan en riñones, pulmones, articulaciones y piel.

d) Reacciones Tipo IV o de hipersensibilidad tardía, mediadas por células T

Estas reacciones no están mediadas por anticuerpos sino que el antígeno interacciona directamente con las células T que actúan como células efectoras. La liberación de quimioquinas tras la producción de un daño en el tejido provoca, en un segundo contacto con el antígeno, la captura y extravasación al tejido afectado de linfocitos T específicos a los que ya se les había presentado el antígeno en un



contacto anterior (sensibilización). Una vez en el tejido, estas células liberan mediadores proinflamatorios (citotoxinas entre otros) y otras citoquinas específicas que atraen hacia el tejido monocitos, macrófagos y otras células T que son las encargadas de mediar la respuesta inflamatoria (Figura 7).



**Figura 7:** Reacciones de hipersensibilidad tardía o Tipo IV, mediadas por células T.

El espectro clínico de las reacciones Tipo IV es amplio y comprende desde manifestaciones leves como los exantemas moderados hasta cuadros clínicos graves como el síndrome de Stevens-Johnson, la necrólisis epidérmica tóxica y el exantema fijo medicamentoso, además de reacciones órgano-específicas entre las que destacan aquellas con afectación cutánea. Debido a la heterogeneidad de las funciones de las células T y de las manifestaciones clínicas asociadas se ha realizado una subclasificación de este tipo de reacciones (Pichler, 2003; Lerch y Pichler, 2004; Padial *et al.*, 2004) aunque no está completamente aceptada en la práctica clínica porque cada subtipo descrito no define específicamente una patología concreta.

- Tipo IVa: Respuesta inmunológica mediada por linfocitos T de tipo Th1 con producción de IFN- $\gamma$ . Se observa una elevada activación e infiltración de monocitos. El eccema es la patología característica de este tipo de reacciones.
- Tipo IVb: Respuesta caracterizada por la presencia de linfocitos T que muestran una respuesta Th2 con producción de IL-4 e IL-5 e infiltración eosinofílica. Dentro de este tipo de reacciones se incluyen diversas patologías como el exantema maculopapular, el exantema bulloso, el síndrome de hipersensibilidad a fármacos o el exantema cutáneo por fármacos con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS).
- Tipo IVc: Respuesta de citotoxicidad celular mediada por linfocitos CD4+ y CD8+, productores de perforina y granzima B y en la que intervienen mecanismos de apoptosis mediados por Fas. Este mecanismo lo encontramos asociado a

diferentes patologías como los exantemas maculopapulares, los eccemas, los exantemas bullosos, los exantemas pustulares y la necrólisis epidérmica tóxica.

- Tipo IVd: Respuesta que se caracteriza por el reclutamiento y activación de neutrófilos mediado por linfocitos T productores de IL-8. Esta respuesta es característica de la pustulosis exantemática generalizada aguda.

#### **2.4.2. Clasificación clínica**

Las reacciones alérgicas a fármacos son difíciles de catalogar según su mecanismo inmunológico por lo que para su diagnóstico en la práctica clínica diaria resulta más sencillo y útil realizar una clasificación basada en el tiempo transcurrido entre la administración del fármaco y la aparición de los síntomas. Siguiendo este criterio y de acuerdo con la clasificación realizada por Levine en 1966 (Levine, 1966) podemos dividir las reacciones alérgicas a fármacos en los siguientes grupos:

##### **a) Inmediatas**

Reacciones que aparecen en la primera hora tras la administración del fármaco y que generalmente están mediadas por anticuerpos IgE específicos. La sintomatología varía desde la urticaria y/o angioedema hasta cuadros clínicos más graves como el choque anafiláctico. Este tipo de reacciones corresponden inmunológicamente con las reacciones Tipo I de la clasificación de Gell y Coombs (Gell y Coombs, 1963).

##### **b) Aceleradas**

Reacciones que ocurren en un intervalo de tiempo superior a 1 hora e inferior a 48 horas tras la administración del fármaco. La sintomatología asociada es fundamentalmente de urticaria. Clásicamente muchos autores las han considerado como reacciones mediadas por anticuerpos IgE, pero se han encontrado evidencias que demuestran la participación de células T (Warrington *et al.*, 1993).

##### **c) Tardías**

Reacciones en las que los síntomas aparecen después de 48 horas tras la administración del fármaco. El espectro clínico de este tipo de reacciones es más amplio y comprende desde reacciones de urticaria y exantemáticas de poca intensidad hasta cuadros clínicos graves como el síndrome de Stevens-Johnson, la necrólisis epidérmica tóxica y reacciones órgano-específicas. De acuerdo con el mecanismo inmunológico implicado, estas reacciones se enmarcarían dentro de las

reacciones Tipo IV o mediadas por células T descritas en la clasificación de Gell y Coombs (Gell y Coombs, 1963).

Desde un punto de vista práctico, las reacciones alérgicas se pueden clasificar en dos grandes grupos: inmediatas y no inmediatas, incluyéndose dentro de las no inmediatas las reacciones aceleradas y tardías (Romano *et al.*, 2004), es decir, todas aquellas reacciones que aparecen a partir de la primera hora tras la administración del fármaco y que en su mayoría están mediadas por células T.

En el presente trabajo nos dedicamos al estudio de las reacciones alérgicas inmediatas, por lo que en los siguientes apartados sólo nos centramos en la descripción de aspectos inmunológicos y clínicos de este tipo de reacciones.

## **2.5. Conceptos y procesos inmunológicos relacionados con las reacciones alérgicas inmediatas**

### **2.5.1. Inmunoglobulina E**

La IgE se descubrió en 1967 por Ishizaka y Johanson, quienes trabajando por separado describieron casi simultáneamente este nuevo isotipo de Ig (Ishizaka e Ishizaka, 1967). Desde su descubrimiento, se ha demostrado que la IgE interviene en las reacciones de hipersensibilidad inmediata y en la respuesta inmunológica frente a infecciones parasitarias (Yazdanbakhsh *et al.*, 2001; Maizels, 2003; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

#### **a) Estructura general**

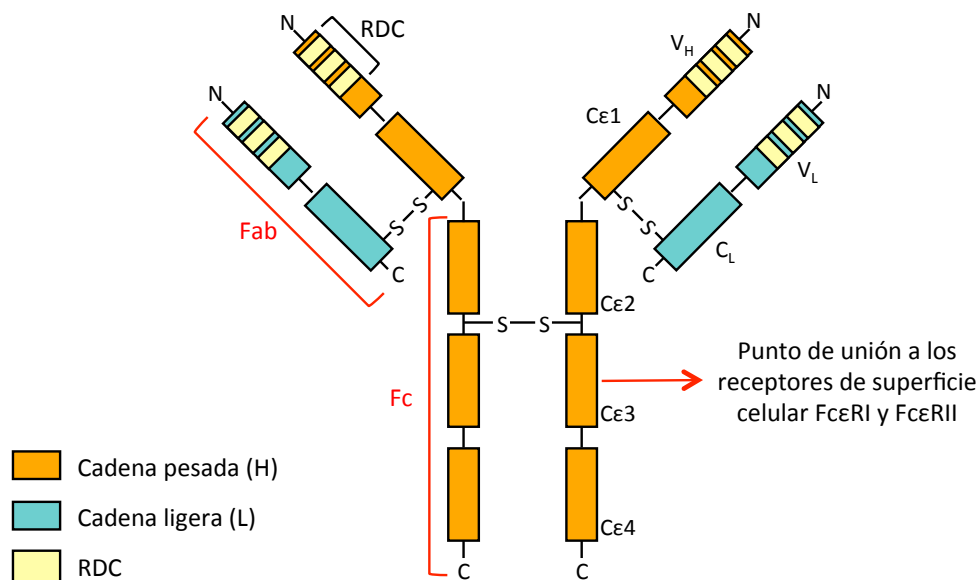
La estructura general de la IgE es similar a la de las otras Igs, con dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) unidas covalentemente por puentes disulfuro. El isotipo IgE se caracteriza por la secuencia proteica de sus cadenas pesadas tipo  $\epsilon$ , que contienen un dominio variable ( $V_H$ ) y cuatro dominios constantes ( $C\epsilon 1-4$ ) (Garman *et al.*, 2000), siendo el dominio  $C\epsilon 2$  de la IgE el que reemplaza a la región bisagra que aparece en otros isotipos (Sutton y Gould, 1993) y el dominio  $C\epsilon 3$  el punto de unión a los receptores de superficie celular (Figura 8). El peso molecular de la molécula completa es de 118-196 kDa (Kulczycki, 1987).

Como en todas las Igs, en la IgE se distinguen dos regiones funcionales: el fragmento de unión al antígeno (Fab) y el fragmento cristalizable (Fc). La región Fab es la región variable formada por el extremo N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras, en ella reside la especificidad de la Ig y la capacidad de reconocer y unirse al

antígeno. La región Fc es una región constante compuesta por la porción C-terminal de las cadenas pesadas y es la mediadora de las funciones efectoras de la Ig.

Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas interaccionan entre sí para formar una unidad globular que contiene el sitio de unión con el antígeno. Dentro de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas existen ciertos segmentos con secuencias muy variables que se denominan regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (RDC). Las RDC están compuestas por unos diez aminoácidos y forman una superficie de contacto complementaria a la estructura tridimensional del antígeno al que se une la Ig. El resto del dominio no está involucrado directamente en el reconocimiento del antígeno pero actúa como soporte.

Los anticuerpos IgE se unen de forma reversible por su región Fc a un receptor específico para las cadenas pesadas  $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ ) (Sutton y Gould, 1993). Existen dos tipos de receptores: los receptores de alta afinidad (Fc $\epsilon$ RI) que se expresan en la superficie de mastocitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas y células de Langerhans, y los receptores de baja afinidad (Fc $\epsilon$ RII) que se expresan en la superficie de monocitos y células B.



**Figura 8:** Esquema de la estructura general de la IgE.

#### b) Síntesis y concentración sérica

Las moléculas de IgE son producidas principalmente por las células plasmáticas en tejidos linfoides asociados a mucosas (Geha *et al.*, 2003). La mayoría de la IgE producida se une a los receptores Fc $\epsilon$ RI expresados en la superficie de

mastocitos y basófilos (Geha *et al.*, 2003) y el resto se une a los receptores FcεRII o circula libre por el torrente sanguíneo. La vida media de la IgE en suero es de sólo 3 días en comparación con los 20 días de la IgG, pero aumenta cuando la IgE se retiene en los tejidos unida a receptores de la superficie celular (Iio *et al.*, 1978).

La concentración sérica de la IgE es la más baja de todas las Igs. En individuos no alérgicos, los niveles séricos de IgE total son entre 10.000 y 50.000 veces inferiores a los de IgG, e incluso en individuos atópicos con valores muy altos de IgE la concentración sigue siendo unas 1.000 veces inferior a la de IgG (Geha *et al.*, 2003), por ello son necesarias técnicas de alta sensibilidad para su detección (King *et al.*, 1991). Una característica importante de la IgE es que a pesar de su baja concentración su acción se amplifica por numerosos factores entre los que se encuentra la actividad de los receptores celulares a los que se une (Sutton y Gould, 1993).

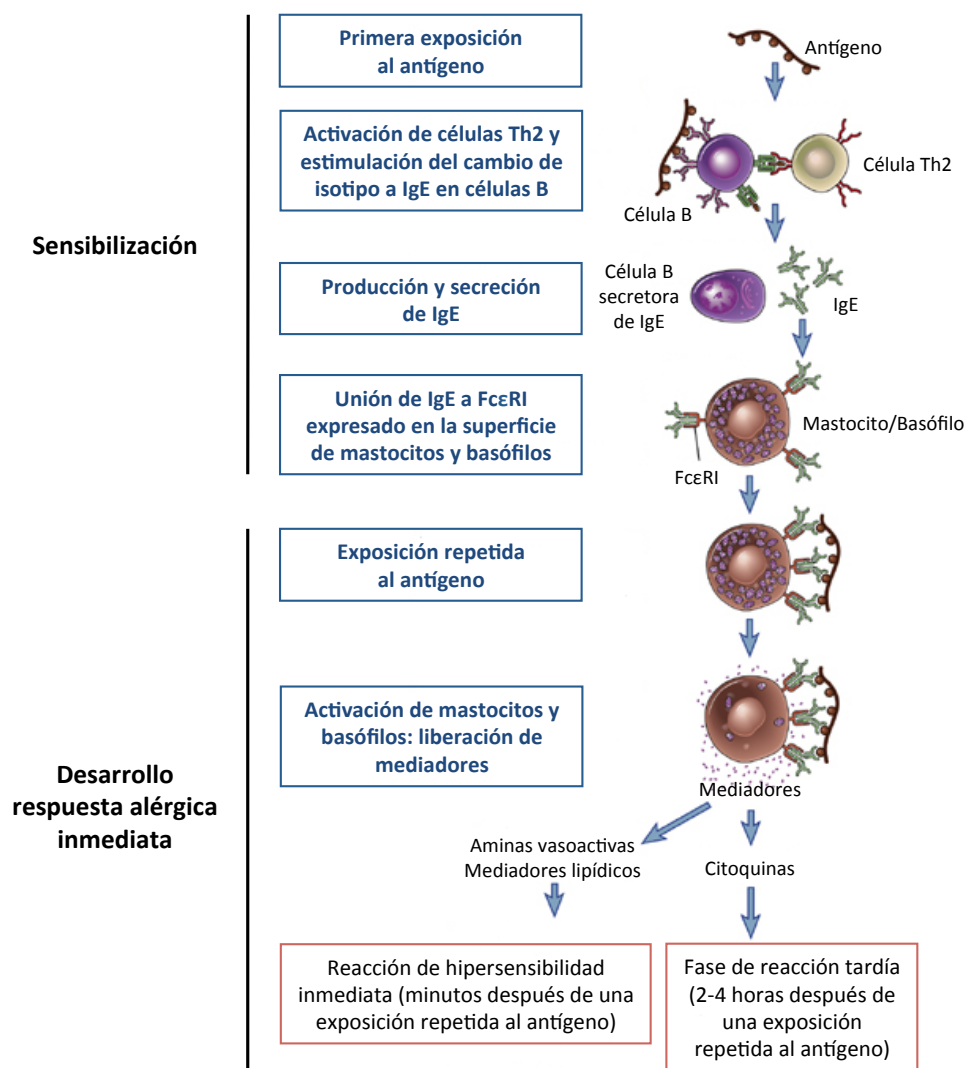
En adultos sanos la concentración de IgE total en plasma es inferior a 20 UI/ml y la de IgE específica no supera las 0,35 UI/ml (Smurthwaite y Durham, 2002), pero estos valores varían con la edad. Los niveles séricos de IgE no son detectables cuando el individuo nace porque esta Ig no tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria, pero tras el nacimiento su concentración sérica aumenta progresivamente hasta alcanzar un pico máximo a los 10-15 años que después disminuye hasta mantenerse constante durante toda la vida adulta.

En individuos atópicos la concentración de IgE total circulante puede superar unas 10-50 veces los valores normales, y en personas que desarrollan una reacción alérgica tiene lugar una producción amplificada de IgE específica y no específica frente al antígeno que induce la reacción, pudiendo alcanzar unos niveles de IgE 1.000 veces superiores a los de individuos sanos no alérgicos.

En ciertas enfermedades de tipo infeccioso e inmunológico podemos observar un aumento de los niveles de IgE sin que se muestren signos de enfermedad alérgica. Algunos de estos casos son enfermedades parasitarias causadas por helmintos, ciertas infecciones víricas como la mononucleosis y las producidas por los citomegalovirus, determinadas inmunodeficiencias primarias y en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Además, en trasplantes de médula ósea se ha observado la aparición de un pico de IgE probablemente como consecuencia de una alteración en el control de su producción.

### 2.5.2. Mecanismos inmunológicos implicados en las reacciones alérgicas inmediatas

Todas las reacciones alérgicas inmediatas tienen características comunes, aunque difieren notablemente en los tipos de antígenos que las desencadenan y en sus manifestaciones clínicas y anatomopatológicas. Este tipo de reacciones requieren un período de sensibilización previo tras la primera exposición al antígeno, en el que se sintetizan anticuerpos IgE específicos implicados en el desarrollo de una respuesta alérgica después de una nueva exposición a dicho antígeno (Abbas *et al.*, 2008a) (Figura 9).



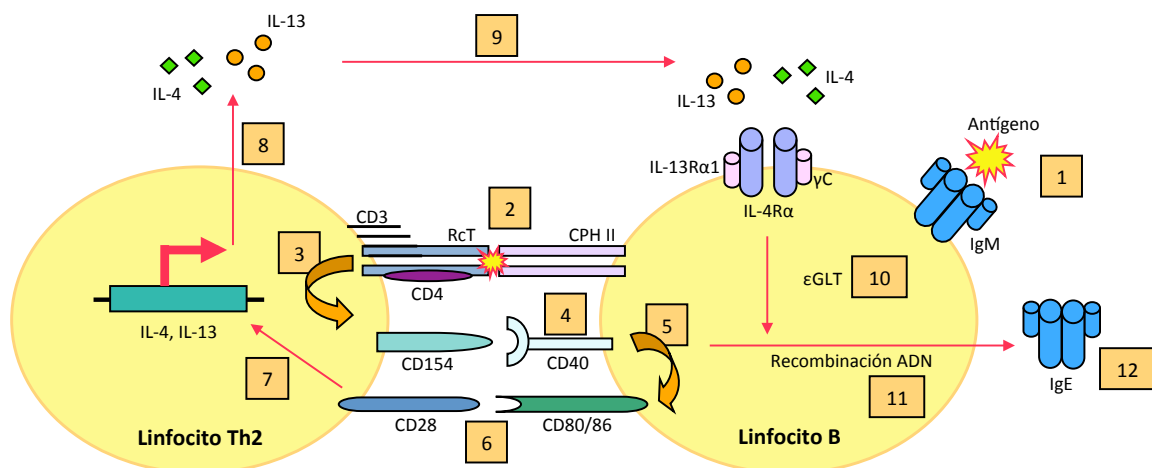
Abbas *et al.*: Cellular and Molecular Immunology, 7e.  
Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

**Figura 9:** Secuencia de acontecimientos de las reacciones alérgicas inmediatas: fase de sensibilización y desarrollo de la respuesta alérgica inmediata. Imagen tomada de Abbas *et al.* En: Cellular and Molecular Immunology, 7th Ed, 2012 (Abbas *et al.*, 2012).

a) Fase de sensibilización

- Activación de linfocitos Th2: La entrada en el organismo de un antígeno pone en marcha un proceso silencioso de sensibilización, que comienza cuando las CPA capturan los antígenos, los transportan a los ganglios linfáticos, los procesan y los presentan como péptidos a los linfocitos T cooperadores (Figura 9). A continuación, estos linfocitos se diferencian en la subpoblación Th2 de células efectoras, que son las que estimulan la síntesis de IgE, sobre todo mediante la secreción de IL-4 e IL-13. En los focos de las reacciones de hipersensibilidad inmediata encontramos agregados de linfocitos Th2 que son atraídos gracias a la acción de las citoquinas y quimioquinas secretadas por distintos tipos celulares presentes en estas regiones.

- Activación de los linfocitos B y cambio de isotipo a IgE: Los linfocitos Th2 activan a los linfocitos B específicos para los antígenos que han entrado en el organismo. Durante la respuesta inmunológica, las células B pueden expresar diferentes isotipos de Igs, lo que permite tener anticuerpos con la misma especificidad pero con diferente función efectora. Para que los linfocitos B experimenten el cambio de isotipo de cadena pesada y sinteticen IgE son necesarias dos señales que se producen a través de una compleja serie de interacciones con el antígeno y con las células T específicas (Vercelli, 2009) (Figura 10).



**Figura 10: Cambio de isotipo a IgE.** Una célula B que expresa IgM específica para el antígeno se une a éste por medio de las Igs de su superficie celular (1), lo procesa y lo presenta a una célula T tipo Th2 específica de ese antígeno (2). La formación del complejo tri-molecular RCT-antígeno-CPH de clase II induce una expresión rápida en los linfocitos T de CD154 (3), que es el ligando del receptor CD40 que se expresa constitutivamente sobre los linfocitos B (4). La interacción entre las células T y B mediadas por la vía CD40/CD154 (4) se amplifica por interacciones entre moléculas coestimuladoras, particularmente la pareja

ligando/receptor CD28/CD80-CD86 **(5)**. La unión de CD40 regula la expresión de CD80-CD86 sobre las células B **(5)**. CD80-CD86 se une a CD28 **(6)** e induce la transcripción **(7)** y secreción **(8)** de IL-4 y/o IL-13, que se unirán a sus receptores heterodiméricos en los linfocitos B **(9)**. En un mismo paso, la célula B recibe las dos señales necesarias para el cambio de isotipo a IgE: IL-4 dispara la transcripción de la cadena pesada  $\epsilon$  **(10)** y la unión de CD40 con su ligando activa la recombinación de ADN para la región  $\epsilon$  **(11)**, provocando el cambio de isotipo a IgE y la secreción de anticuerpos IgE **(12)**. Imagen tomada de Vercelli D, Immunobiology of IgE. En: Middleton's Allergy, 7th Ed, 2009 (Vercelli, 2009).

Una de las señales es dependiente de citoquinas producidas por linfocitos Th2 (principalmente IL-4) y tiene como resultado la activación de la transcripción de la cadena pesada  $\epsilon$  de la IgE. La otra señal es dependiente de CD40, que es un receptor que se expresa de forma constitutiva sobre los linfocitos B y que induce la recombinación del ADN para la región de la cadena pesada  $\epsilon$  (Monticelli *et al.*, 1998) y la expresión de IgE. De este modo, se genera un gran número de anticuerpos IgE específicos que pasan a la circulación sanguínea.

- Unión de IgE a mastocitos y basófilos: Una gran proporción de los anticuerpos IgE liberados al torrente sanguíneo se unen de forma reversible por su región Fc a receptores de alta afinidad específicos (Fc $\epsilon$ RI) que se expresan en la superficie de mastocitos y basófilos (Sutton y Gould, 1993). De este modo, los mastocitos y basófilos quedan sensibilizados frente al antígeno para el que tienen IgE específica unida en su superficie. La afinidad de Fc $\epsilon$ RI por la IgE es muy alta ( $[K_d] = 1 \times 10^{-10}$  M), y esta unión es mucho más estable que la de cualquier otro receptor con su ligando. Aunque la concentración sérica normal de IgE es baja (inferior a  $5 \times 10^{-10}$  M) en comparación con la de otros isotipos de Ig, es lo suficientemente alta como para permitir que los receptores Fc $\epsilon$ RI estén ocupados por moléculas de IgE y los mastocitos y basófilos de todos los individuos estén recubiertos de IgE.

#### b) Desarrollo de la respuesta alérgica inmediata

En un individuo sensibilizado frente a un determinado antígeno, una gran proporción de la IgE unida a los receptores Fc $\epsilon$ RI expresados en la superficie de mastocitos y basófilos es específica frente al mismo y cuando el individuo se expone de nuevo al antígeno se desencadena una respuesta inmunológica (Figura 9). En esta nueva exposición, el antígeno interacciona con la región Fab de dos o más moléculas de IgE adyacentes de la superficie celular de mastocitos y basófilos, fenómeno que se denomina puenteo y que desencadena la activación de estas células.



La activación de los mastocitos y los basófilos provoca cambios en su membrana celular y desencadena una serie de reacciones en cascada que finaliza con la secreción de un gran número de mediadores preformados en los gránulos celulares (histamina, triptasa, heparina o factores quimiotácticos) mediante un proceso regulado de exocitosis, con la síntesis y la secreción de mediadores lipídicos (leucotrienos y prostaglandinas) (Siraganian, 1988) y con la síntesis y secreción de citoquinas que pueden contribuir a la inflamación alérgica (TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-3, GM-CSF) (Figura 9). Algunas de estas citoquinas potencian la expresión de moléculas de adhesión leucocítica, como la selectina E y moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, lo que facilita la atracción de leucocitos inflamatorios hacia los tejidos. Todos estos mediadores liberados son los responsables de las manifestaciones clínicas características de estos procesos y sus principales efectos son la vasodilatación y la contracción del músculo liso, que ocurren con gran rapidez después de la exposición al antígeno (reacción inmediata) y una reacción retardada que produce principalmente inflamación.

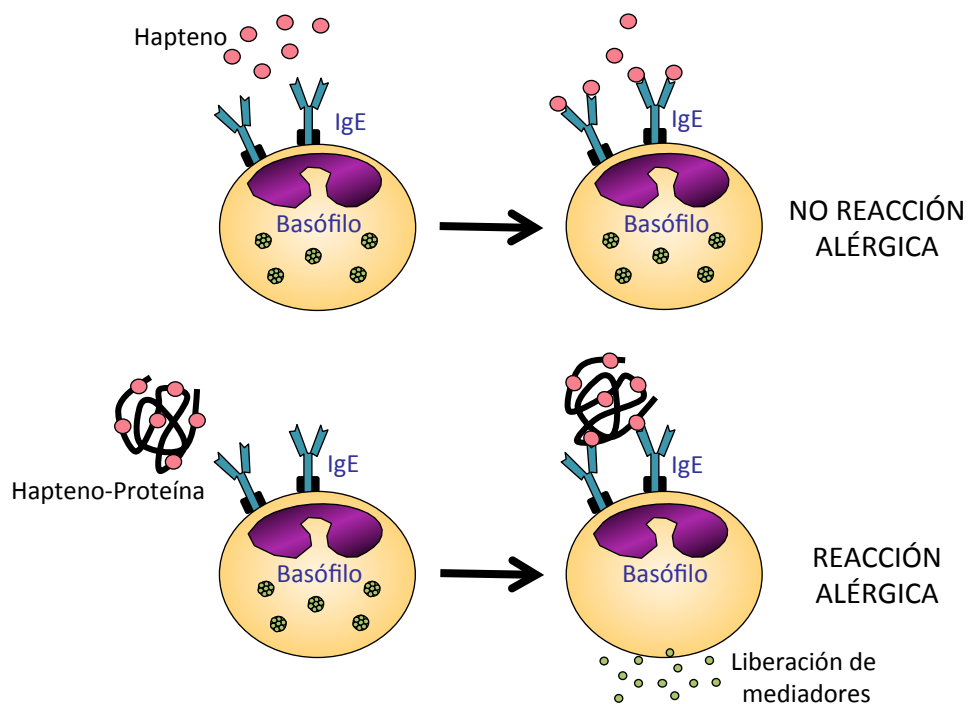
### **3. Fármacos como haptenos**

#### **3.1. Hipótesis del hapteno**

El modelo actual más aceptado por la comunidad científica para explicar el modo en el que el SI reconoce a los fármacos está basado en la hipótesis del hapteno formulada por Landsteiner en 1935 (Landsteiner y Jacobs, 1935). Por definición, un hapteno es una especie de bajo peso molecular (en general inferior a 1000 Da), químicamente reactiva y demasiado pequeña para inducir una respuesta inmunológica por sí misma pero sí cuando se une covalentemente a macromoléculas, proceso que se denomina haptización (Landsteiner y Jacobs, 1935; Eisen *et al.*, 1952; Pirmohamed *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1998; Pichler, 2003).

En general, los fármacos químicamente reactivos y sus metabolitos se comportan como haptenos y forman aductos covalentes con macromoléculas tales como proteínas endógenas. El hecho de que los haptenos sean incapaces de activar por sí mismos al SI se debe a que, salvo algunas excepciones, las estructuras antigénicas se deben presentar al SI en forma de antígeno multivalente para desencadenar una respuesta inmunológica específica y para activar los mecanismos inmunopatológicos (Figura 11). Según esta hipótesis, después de la unión covalente

del hapteno a una macromolécula endógena, el conjugado hapteno-molécula portadora puede ser procesado y presentado por las CPA a los linfocitos para la producción de anticuerpos específicos que pueden reaccionar contra el determinante antigénico formado por el hapteno y posiblemente por algunas regiones de la molécula portadora. Es importante destacar que la respuesta frente a conjugados hapteno-molécula portadora depende de la densidad del hapteno (Park *et al.*, 1987) y de la distribución de éste en la molécula portadora (Lee *et al.*, 1985).



**Figura 11:** Hipótesis del hapteno propuesta por Landsteiner (Landsteiner y Jacobs, 1935).

El peso molecular es una de las principales características que determinan la capacidad inmunogénica de una molécula (Park *et al.*, 1987; Klaus y Humphrey, 1993) pero también son importantes su naturaleza química y su complejidad estructural (Baldo *et al.*, 1994). En general, las proteínas son las macromoléculas con mayor capacidad inmunogénica y los hidratos de carbono, los lípidos y los ácidos nucleicos son estructuras menos inmunogénicas. No se conocen completamente las razones por las que las moléculas de mayor peso molecular son más inmunogénicas (Pirmohamed y Park, 1996) pero algunas de las razones podrían ser su capacidad de persistir en el organismo el tiempo suficiente para ser captadas por las CPA y la mayor probabilidad de presentar múltiples epítomos.

Se ha podido demostrar la capacidad inmunogénica de ciertos conjugados de proteínas autólogas con fármacos y metabolitos de fármacos en modelos animales (Christie *et al.*, 1988; Gill *et al.*, 1997; Park y Kitteringham, 1990), pero se conoce muy poco sobre la naturaleza de proteínas séricas y celulares a las que se unen los fármacos tras su administración en el organismo y el papel que desempeñan en el desarrollo de la respuesta inmunológica.

La albúmina sérica humana (HSA) siempre se ha considerado como la principal proteína diana de los procesos de hapténización, ya que es el constituyente proteico soluble mayoritario del sistema circulatorio y está implicada en el transporte, circulación y metabolismo de multitud de ligandos endógenos y exógenos y también de numerosos fármacos (Fasano *et al.*, 2005). Sin embargo, existen muchas otras proteínas de diferente naturaleza que podrían ser hapténizadas por fármacos y a partir de algunos estudios se ha podido observar la participación de otras proteínas plasmáticas y celulares en los procesos de hapténización. Mediante técnicas proteómicas se ha podido identificar a la HSA y a la transferrina como proteínas plasmáticas modificadas por ampicilina (AMP) en pacientes tratados con dicho fármaco (Magi *et al.*, 1995), y recientemente se ha estudiado mediante espectrometría de masas la modificación de la HSA por flucloxacilina (Jenkins *et al.*, 2009), piperacilina (Whitaker *et al.*, 2011) y BP (Meng *et al.*, 2011) en muestras generadas *in vitro* y en muestras séricas de pacientes tratados con dichos fármacos.

Otros estudios han propuesto la formación de antígenos funcionales a partir del metabolismo del sulfametoxazol y la unión de los metabolitos reactivos resultantes a proteínas intracelulares (Elsheikh *et al.*, 2010), lo que plantea la importancia de los metabolitos extrahepáticos en las reacciones alérgicas. En ciertos órganos, tales como la piel, los metabolitos producidos por la oxidación o la fotoactivación son especialmente relevantes (Karlberg *et al.*, 2008; Andreu *et al.*, 2010), como ocurre con el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico que es un metabolito del triflusal que se une covalentemente a la HSA tras la fotoactivación, lo que proporciona un mecanismo para la hapténización de proteínas y probablemente para el desarrollo de la fotoalergia (Montanaro *et al.*, 2009). Otros fármacos como la fenotiacina y la flufenacina también pueden sufrir un proceso de fotoactivación y formar aductos que pueden estar involucrados en la fotosensibilidad y en la agranulocitosis (Caffieri *et al.*, 2007).

Finalmente, hay que considerar la influencia de ciertas alteraciones fisiológicas en el proceso de haptización por fármacos. Hay estudios que muestran un aumento en el número de aductos de proteínas con sulfametoxazol en situaciones patológicas en las que las células están expuestas a endotoxinas bacterianas, citoquinas o a diferentes estímulos inflamatorios (Lavergne *et al.*, 2009), y se ha descrito que la HSA es sensible a modificaciones oxidativas (Oetl y Stauber, 2007) que pueden alterar sus propiedades de unión a diferentes ligandos e incluso su potencial inmunogénico y proinflamatorio (Kormoczi *et al.*, 2001), aunque son necesarios más estudios para comprender el papel y la relevancia del contexto fisiológico y de los diferentes factores concomitantes en la formación de aductos entre fármacos y proteínas en el organismo.

### **3.1.1. Mecanismos de haptización**

#### **a) Haptización directa**

Existen fármacos que son químicamente reactivos y capaces de reaccionar de forma covalente con macromoléculas en condiciones fisiológicas para formar complejos multivalentes hapteno-molécula portadora, como ocurre con las penicilinas y las cefalosporinas (Padovan *et al.*, 1996).

#### **b) Haptización a través de la bioactivación del fármaco**

La mayoría de los fármacos no son químicamente reactivos y es necesario un proceso de bioactivación previo para obtener metabolitos químicamente reactivos con capacidad de unirse covalentemente a macromoléculas. En estos casos hablamos de prohaptenos y un ejemplo típico de estos fármacos es el sulfametoxazol (Cribb y Spielberg, 1993; Pichler, 2003; Gruchalla, 2003).

Los metabolitos intermediarios reactivos pueden formarse a través de diferentes procesos tales como la oxidación, mediada principalmente por enzimas de la familia del citocromo P450 (Phol *et al.*, 1988; Wilson, 1991), la acetilación o la fotoactivación, y estos metabolitos ya tienen capacidad de unirse de forma covalente a macromoléculas endógenas generando complejos multivalentes hapteno-molécula portadora.

La formación de estos metabolitos reactivos puede ser tóxica para el organismo, pero en la mayoría de los individuos esta generación de metabolitos se puede compensar gracias a un proceso de bioinactivación. Sin embargo, en determinadas personas el balance entre bioactivación y bioinactivación puede verse

afectado por factores genéticos o por otros factores tales como infecciones concurrentes o la administración de otros fármacos. En estas situaciones de desequilibrio los metabolitos tóxicos escapan del proceso de bioinactivación y provocan un daño celular directo o intervienen en la haptenización de macromoléculas generando neoantígenos que pueden inducir una respuesta inmunológica. Las causas que provocan este desequilibrio siguen siendo desconocidas para la mayoría de los fármacos.

### **3.1.2. Modelos de reconocimiento de haptenos por células T específicas**

Los procesos clave en una respuesta inmunológica frente a un fármaco comprenden un proceso de haptenización, el procesamiento del complejo antigénico y su presentación a las células que regulan la respuesta inmunológica.

Por definición, una proteína modificada por un hapteno será una proteína extraña para el organismo y será reconocida como tal por el SI. Estas proteínas haptenizadas deben ser procesadas por las CPA antes de ser presentadas a los linfocitos T y B. El procesamiento consiste en la degradación de las proteínas en péptidos que no contienen más de 8-15 aminoácidos en los que el hapteno todavía puede estar unido (Kalish, 1995) y que son presentados en la superficie de las CPA unidos de forma no covalente a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

Existen dos vías de procesamiento en función de la localización extracelular o intracelular de las proteínas haptenizadas. Estas vías determinan si los péptidos y los péptidos modificados son presentados por las moléculas del CPH de clase I o II y por tanto definirán la naturaleza de la respuesta inmunológica (Kalish, 1995). Las moléculas del CPH de clase I se expresan sobre todas las células nucleadas, sin embargo, la expresión de moléculas del CPH de clase II está restringida a la superficie de CPA tales como los macrófagos, células B, células de Langerhans y células dendríticas. A continuación se detallan las dos vías de procesamiento:

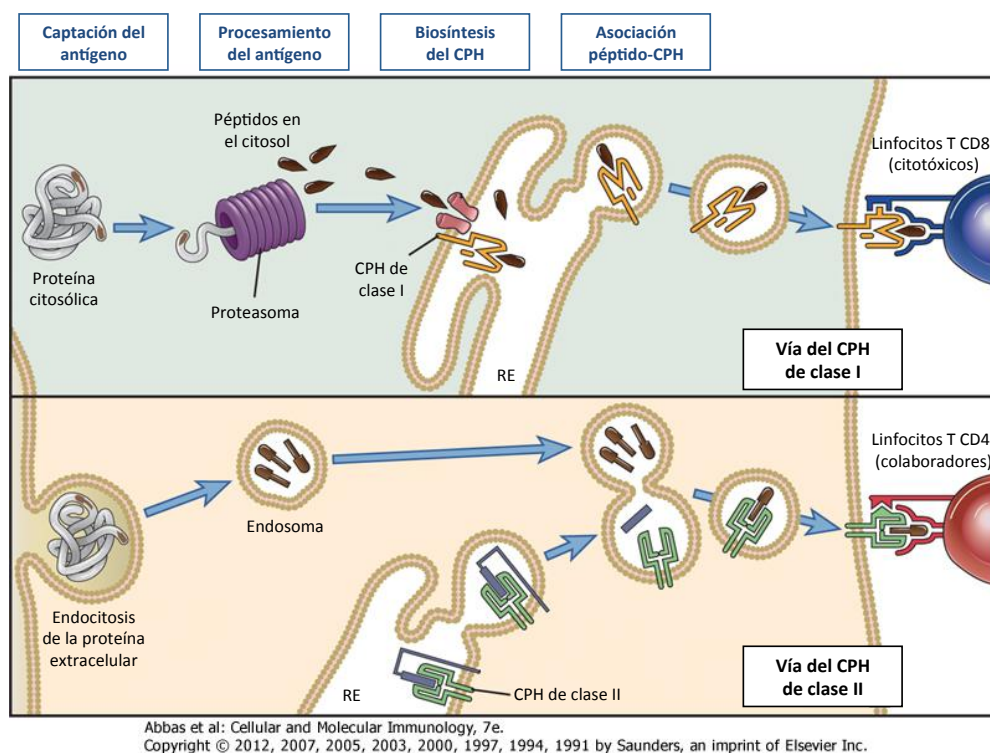
#### **a) Procesamiento de antígenos intracelulares para su presentación asociada al CPH de clase I**

Los antígenos formados por fármacos o metabolitos unidos a proteínas intracelulares son procesados mediante degradación proteosomal. Los péptidos generados en el citosol se transportan hacia el retículo endoplásmico (RE), donde hay moléculas del CPH de clase I recién sintetizadas para unirse a ellos. Los péptidos

transportados hacia el interior del RE se unen de manera preferente a las moléculas del CPH de clase I y se exponen en la superficie celular donde pueden ser reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) (Abbas *et al.*, 2008b) (Figura 12).

b) Procesamiento de antígenos extracelulares endocitados para la presentación asociada al CPH de clase II

Los fármacos o metabolitos unidos a proteínas extracelulares son captados e interiorizados en endosomas por CPA. Las proteínas interiorizadas se degradan por acción enzimática en los endosomas y lisosomas. Las moléculas del CPH de clase II se sintetizan en el RE y se transportan a los endosomas donde se asocian a los péptidos generados. Finalmente, los complejos péptido-CPH de clase II se expresan sobre la superficie de las CPA para su reconocimiento por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (cooperadores), que a su vez se pueden subdividir en linfocitos Th1 y Th2 (Abbas *et al.*, 2008b) (Figura 12).

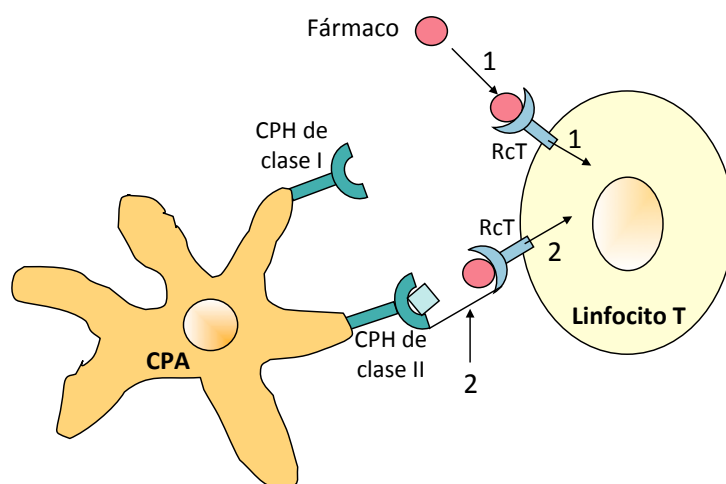


**Figura 12: Vías de procesamiento y presentación de antígenos por las CPA.** En la vía del CPH de clase I (recuadro superior), los antígenos proteicos intracelulares son procesados mediante proteasomas y los péptidos se transportan hacia el RE, donde se unen a moléculas del CPH de clase I. En la vía del CPH de clase II (recuadro inferior), los antígenos proteicos extracelulares se endocitan en vesículas en las que se procesan los antígenos y los péptidos se unen a las moléculas del CPH de clase II. Imagen tomada de Abbas *et al.* En: Cellular and Molecular Immunology, 7th Ed, 2012 (Abbas *et al.*, 2012).

La separación entre la vía intracelular y extracelular no es absoluta. De acuerdo con el esquema propuesto, la localización de los fármacos determinará si forman conjugados covalentes con proteínas extracelulares o intracelulares y por tanto si son procesados por una vía u otra, lo que dependería de la disposición celular del fármaco, de sus metabolitos reactivos y de las vías y sitios de bioactivación y bioinactivación. Según este modelo, las reacciones alérgicas inmediatas se desarrollarían por la formación de conjugados covalentes de fármacos con proteínas circulantes o extracelulares ya que son los que interaccionarían con los linfocitos Th2 que activan a las células B para la síntesis de anticuerpos IgE.

### 3.2. Concepto de la interacción farmacológica con receptores inmunológicos (“p-i concept”)

La hipótesis del hapteno sólo se ha podido demostrar con algunos fármacos, por ello en los últimos años se ha descrito un nuevo modelo según el cual existen fármacos que no necesitarían unirse covalentemente a una macromolécula para inducir una respuesta inmunológica, sino que podrían unirse de forma directa (sin metabolismo previo del fármaco) y reversible a receptores inmunológicos como el CPH o los receptores de células T (RcT) mediante fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno (Figura 13). Este modelo recibe el nombre de interacción farmacológica con receptores inmunológicos (p-i concept) (Pichler, 2002).



**Figura 13: Activación de linfocitos T según el modelo del “p-i concept”.** El fármaco se une a varios RcT **(1)** con la suficiente afinidad para desencadenar una señal. La interacción fármaco-RcT se complementa con la interacción con el CPH **(2)**. Imagen tomada de Çelik G *et al.*, Drug Allergy. En: Middleton’s Allergy, 7th Ed, 2009 (Çelik *et al.*, 2009).

Se han documentado procesos de presentación de fármacos mediante interacciones no covalentes que provocan la activación de células T específicas, pero la importancia real de este mecanismo así como su especificidad necesitan ser confirmadas *in vivo*, por lo que este modelo se admite en la actualidad con reservas. Algunos de los fármacos para los que se ha demostrado esta interacción farmacológica directa son el sulfametoxazol (Schnyder *et al.*, 1997; Nassif *et al.*, 2002), la lamotrigina (Naisbitt *et al.*, 2003b) y la carbamacepina (Naisbitt *et al.*, 2003a).

El modelo clásico de la hipótesis del hapteno y el modelo del “p-i concept” no son excluyentes, de hecho se sabe que el sulfametoxazol, la lamotrigina y la carbamacepina pueden formar complejos hapteno-molécula portadora después de su metabolismo, por lo que los mecanismos implicados en la hipótesis del hapteno y en el modelo del “p-i concept” podrían ocurrir simultáneamente en el desarrollo de una respuesta alérgica (Schnyder *et al.*, 2000).

### **3.3. Teoría del peligro e importancia de las “señales de peligro” en el contexto de la hipótesis del hapteno**

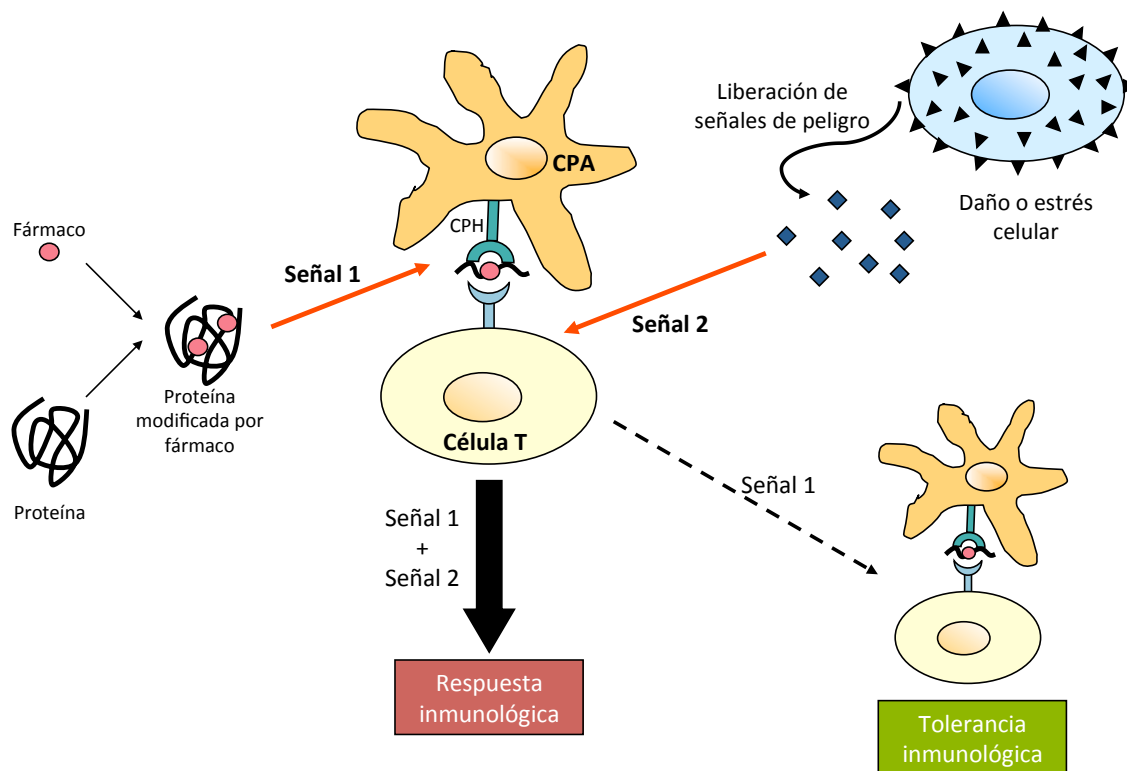
El principal aspecto de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos es que una pequeña modificación química en una proteína autóloga puede conducir al desarrollo de una respuesta inmunológica dirigida específicamente contra esa proteína modificada, que en última instancia produce daños en los tejidos a través de distintos mecanismos inmunológicos o puede desencadenar una respuesta inmunológica sin provocar un daño tisular. De acuerdo con la teoría del peligro propuesta por Matzinger (Matzinger, 1994), el SI no responde a entidades “extrañas” pero sí a entidades “peligrosas”. Este modelo sugiere que la fuerza motriz del SI es la necesidad de detectar el peligro y proteger al organismo frente a él, por lo que el SI sólo responde a los antígenos asociados con el peligro que en este contexto se puede definir como cualquier elemento que cause estrés o muerte celular.

De acuerdo con este modelo, son necesarias dos señales para que se desarrolle una respuesta inmunológica. La señal 1 se define como aquella señal que se produce cuando un receptor específico de un antígeno (Ig o RcT) contacta con su antígeno, y la señal 2 es un conjunto de señales coestimuladoras tales como infecciones concurrentes, la exposición a endotoxinas, la estimulación por citoquinas, alteraciones metabólicas o la toxicidad de fármacos, y que se han



denominado “señales de peligro” (Lavergne *et al.*, 2009). La presencia o ausencia de la señal 2 determina que se produzca una respuesta inmunológica o un mecanismo natural de tolerancia inmunológica (Matzinger, 1994).

En general se pueden detectar aductos fármaco-proteína en personas que toleran dicho fármaco y sólo algunos individuos llegan a desarrollar una reacción alérgica. Este hecho pone de manifiesto la importancia de las señales coestimuladoras en la activación del SI. Según la hipótesis del hapteno, para que se produzca una reacción alérgica a un fármaco es necesaria la haptenización de proteínas endógenas y la presentación de los nuevos epítopos a las células T por el CPA (señal 1) y en el contexto de la teoría del peligro sería necesaria la existencia de una situación de estrés o de daño celular, posiblemente ocasionada por el fármaco o por un metabolito reactivo, que induciría la liberación de factores coestimulatorios (señal 2) para la respuesta inmunológica; de modo que la ausencia de estos factores coestimulatorios conllevaría una situación de tolerancia inmunológica (Figura 14).



**Figura 14:** Teoría de las “señales de peligro” aplicada al mecanismo descrito en la hipótesis del hapteno.

Hay estudios en los que se ha observado que las “señales de peligro” aumentan la formación de aductos fármaco-proteína (Lavergne *et al.*, 2009) y que los factores que alteran las condiciones redox del organismo pueden ser

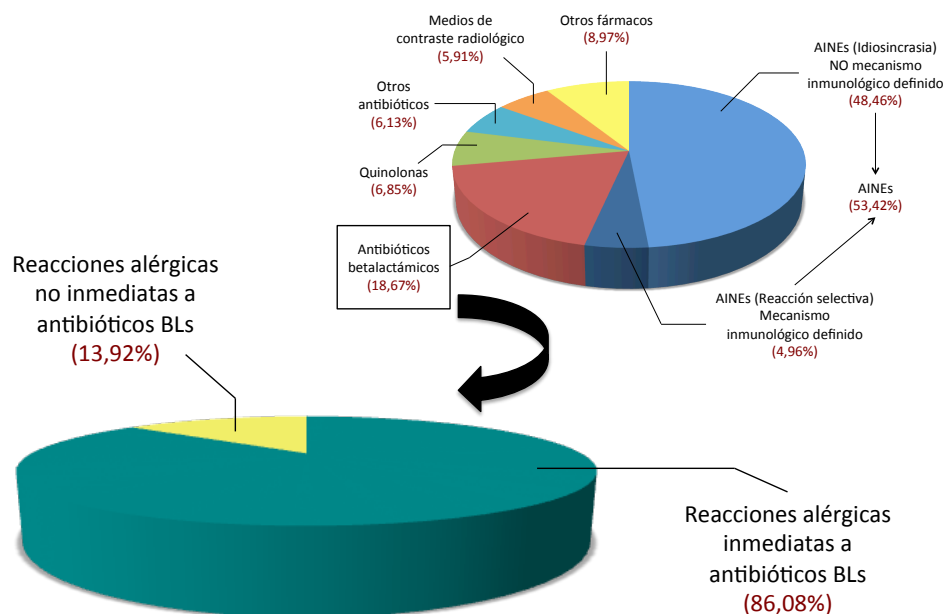
importantes en la formación de aductos con fármacos que tienen capacidad de reaccionar con grupos tioles, y que por tanto pueden ser relevantes para las propiedades antigénicas de dicho fármaco (Gayarre *et al.*, 2005).

## 4. Reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos betalactámicos

### 4.1. Aspectos clínicos

#### 4.1.1. Características generales

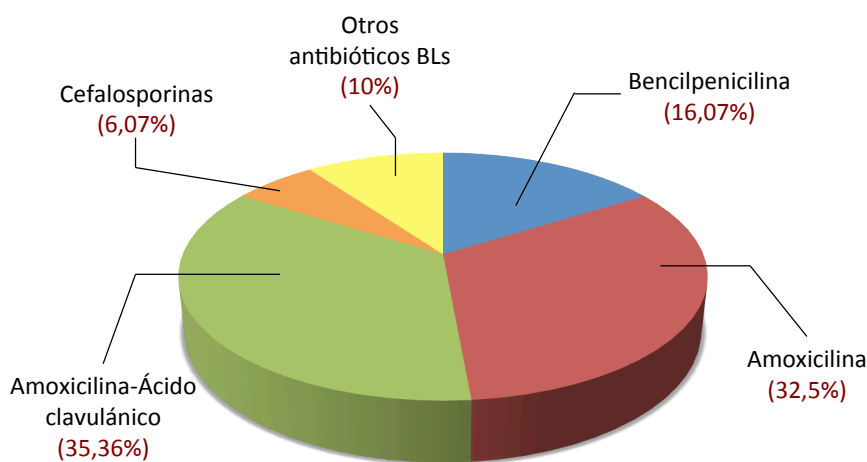
Las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs son las reacciones alérgicas a fármacos más frecuentes mediadas por un mecanismo inmunológico específico y pueden ser inducidas por cualquiera de las estructuras BLs disponibles (Antunez *et al.*, 2006b; Gueant *et al.*, 2006) (Figura 15). Aparecen normalmente en un intervalo de tiempo inferior a una hora tras de la administración del fármaco y están mediadas por anticuerpos IgE que reconocen específicamente estas estructuras (Antunez *et al.*, 2006b; Gueant *et al.*, 2006; Blanca *et al.*, 2009; Torres y Blanca, 2010). Dentro de los antibióticos BLs, las penicilinas son los fármacos con un mayor consumo en la población y están relacionados con el mayor número de reacciones alérgicas inmediatas, por lo que han sido los fármacos más estudiados y de los que se conoce bien su inmuoquímica, empleándose como fármacos modelo para estudio de las reacciones alérgicas a otros medicamentos (Ahlstedt y Kristofferson, 1982).



**Figura 15:** Porcentaje de reacciones alérgicas inmediatas y no inmediatas a antibióticos BLs según un estudio realizado por Doña *et al.* (Doña *et al.*, 2012).

El uso clínico de los antibióticos BLs se inició con la administración de la BP o penicilina G a un paciente con sepsis estafilocócica en 1941 (Abraham *et al.*, 1992), y se empezó a usar de forma masiva a finales de la Segunda Guerra Mundial, donde se hizo evidente su valor terapéutico. Alrededor de 1945 empezaron a detectarse reacciones adversas atribuidas a la penicilina, entre las que se registraron diferentes manifestaciones clínicas como urticarias, eritemas, convulsiones y reacciones anafilácticas (Idsoe *et al.*, 1968). Unos años más tarde, alrededor los años 50, el número de casos de anafilaxia se incrementó y desde entonces se dio importancia a las reacciones de hipersensibilidad a penicilina, no considerándose inocuo el tratamiento con este antibiótico (Idsoe *et al.*, 1968).

Es importante considerar la alergia a los antibióticos BLs como un sistema dinámico, cuya incidencia está muy relacionada con los niveles de consumo de los diferentes fármacos y donde hay que tener en cuenta la aparición de nuevos antibióticos, la existencia de diferentes poblaciones de diferentes edades y de distintos tiempos de exposición (Idsoe *et al.*, 1968; Blanca, 1995). Desde la introducción de las penicilinas, la población expuesta a estos compuestos ha aumentado, ha cambiado y se ha diversificado con el paso del tiempo (Blanca, 1995), de modo que a lo largo de los años han ido apareciendo reacciones alérgicas a los diferentes antibióticos BLs conforme se han ido incorporando al uso terapéutico. Actualmente la AX y la combinación AX-CLV son los antibióticos BLs que se prescriben con mayor frecuencia tras haber desplazado de forma progresiva a la BP (Blanca, 1995), y son los fármacos implicados con mayor frecuencia en las reacciones alérgicas inmediatas (Figura 16).



**Figura 16:** Porcentaje de reacciones alérgicas a los diferentes antibióticos BLs según un estudio realizado por Doña *et al.* (Doña *et al.*, 2012).

Las reacciones alérgicas inmediatas generalmente se inducen a dosis terapéuticas del fármaco, aunque pueden aparecer tras la exposición a dosis bajas como las usadas en las pruebas cutáneas o a cantidades ínfimas que pueden estar presentes en los alimentos y en las bebidas (Blanca *et al.*, 1996; Co Minh *et al.*, 2006). A pesar de que la principal vía de sensibilización es la administración terapéutica del antibiótico, existen otras vías de sensibilización como la inhalación o el contacto (Moller *et al.*, 1990).

#### **4.1.2. Epidemiología y prevalencia**

No se conoce bien la prevalencia ni la incidencia de las reacciones alérgicas a antibióticos BLs en la población general. La incidencia inicial disminuyó gracias a la mejora en los procesos de producción, al reducir la cantidad de agentes contaminantes y al introducir la síntesis química de estos antibióticos. Sin embargo, el número de casos volvió a aumentar más tarde debido al incremento del tamaño de la población expuesta (Ahlstedt, 1984) y a la variedad de estructuras químicas de estos antibióticos necesaria para aumentar su espectro de acción. Los datos de incidencia varían entre los diferentes estudios realizados, con resultados sobreestimados cuando los pacientes sólo se diagnostican por su historia clínica y con valores subestimados para las reacciones alérgicas reales de carácter leve o grave (Gomes y Demoly, 2005).

Los primeros estudios de prevalencia realizados mostraron que la frecuencia de las reacciones alérgicas a penicilinas estaba comprendida entre el 0,7% y el 10%, siendo la frecuencia de las reacciones de anafilaxia del 0,004-0,015% (Idsoe *et al.*, 1968). Los estudios más recientes determinaron que más del 10% de los pacientes que toman penicilina desarrollan reacciones alérgicas y desde entonces se han publicado numerosos estudios que muestran datos de prevalencia en función de los resultados de las pruebas cutáneas realizadas a pacientes con una historia clínica de alergia. En un estudio realizado por Gadde *et al.* (Gadde *et al.*, 1993), se obtuvieron resultados positivos en las pruebas cutáneas con determinantes de las penicilinas en el 7,1% de los pacientes con una historia clínica positiva y un 1,7% de ellos con una historia negativa, y en estudios realizados en series amplias de pacientes con síntomas cutáneos se observó que sólo en el 19% de los casos se diagnosticaron finalmente como una reacción alérgica inmediata a antibióticos BLs (Gomes y Demoly, 2005). Recientemente en el estudio realizado por Doña *et al.* se determinó

que las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs representaban el 16,07% del total de reacciones de hipersensibilidad a fármacos (Doña *et al.*, 2012).

#### **4.1.3. Manifestaciones clínicas**

Existen diferentes manifestaciones clínicas asociadas a las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs, siendo las principales entidades clínicas la urticaria, acompañada o no de angioedema, y la anafilaxia:

##### **a) Urticaria y/o angioedema**

Estas manifestaciones clínicas se limitan a la piel. La urticaria es una erupción benigna y transitoria caracterizada por la presencia de pápulas y placas eritematosas y edematosas, variables en número y tamaño, con bordes circunscritos y elevados sobre la piel, que palidecen con la presión y que suelen asociarse con prurito. El origen de la urticaria es la presencia de mediadores vasoactivos liberados por los mastocitos o los basófilos a través de mecanismos muy diversos. En biopsias de lesiones urticariales se ha observado dilatación de pequeñas vénulas y capilares localizados en la dermis superficial, ensanchamiento de pápulas dérmicas y engrosamiento de las fibras de colágeno. Las lesiones individuales, dispersas por todo el cuerpo, persisten unas 24 horas y desaparecen sin dejar marcas en la piel. El angioedema tiene su origen en alteraciones patológicas similares a las anteriores que ocurren en la dermis profunda y en el tejido subcutáneo. En el punto de localización del angioedema, la manifestación más visible es la hinchazón, mientras que la piel presenta una apariencia normal. Estas dos manifestaciones clínicas pueden aparecer de forma conjunta (Adkinson, 2009).

##### **b) Anafilaxia**

Consiste en una reacción sistémica inmediata, mediada por IgE y provocada por la rápida liberación de potentes mediadores inflamatorios y vasoactivos por los mastocitos de los tejidos y los basófilos circulantes. Las manifestaciones clínicas aparecen pronto tras la exposición al fármaco y es necesaria la afectación de al menos dos de los siguientes sistemas para hablar de anafilaxia: cutáneo (urticaria, angioedema, enrojecimiento), respiratorio (edema laríngeo, broncoespasmo, congestión, estornudos), cardiovascular (aumento de la permeabilidad vascular, hipotensión, taquicardia, arritmias), gastrointestinal (dolor, diarrea, vómitos) o neurológico (pérdida de consciencia, sensación de muerte inmediata, mareos, dolor de cabeza). El choque anafiláctico es la forma más grave de la anafilaxia en la que se

produce una insuficiencia cardiovascular aguda, con riesgo vital para el paciente y que se caracteriza por hipotensión, cianosis, mareo, sudoración profusa y pérdida de consciencia.

## **4.2. Aspectos químicos de los antibióticos betalactámicos**

### **4.2.1. Definición**

Los antibióticos BLs, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana (Damaso *et al.*, 1984a), constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y está formada por un gran número de compuestos químicos naturales o semisintéticos que se caracterizan por la presencia de un anillo BL en su estructura química.

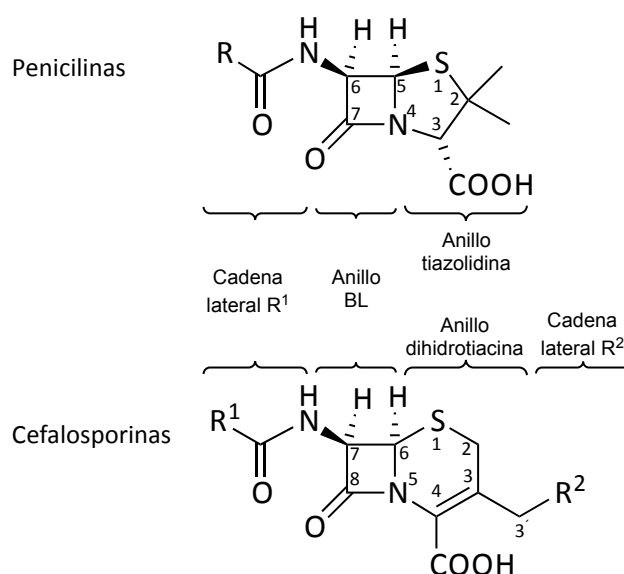
Tras 70 años de uso clínico, los antibióticos BLs son los antimicrobianos más utilizados en la práctica clínica, tanto en atención primaria como en centros hospitalarios. Son compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que en general tienen buena distribución y presentan escasa toxicidad para el organismo y que poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro de acción se ha ido ampliando a lo largo de los años con la incorporación de nuevas moléculas, aunque la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso y su eficacia en determinadas situaciones.

### **4.2.2. Clasificación y estructura química**

Los antibióticos BLs se clasifican en función de su estructura química en seis grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenamas, cefamas, clavamas y monobactamas (Tabla 1). Dentro de esta clasificación, las penicilinas y las cefalosporinas son los dos grupos principales (Figura 17).

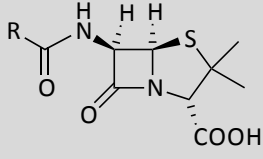
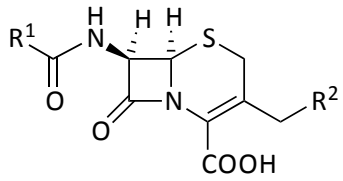
La estructura general de todos los BLs consiste en un anillo BL que, a excepción de las monobactamas, está fusionado con un anillo de tiazolidina o de dihidrotiacina dependiendo del tipo de BL y la unión de ambos anillos constituye el núcleo de la molécula (Figura 17). Todos estos antibióticos, salvo las clavamas, contienen una cadena lateral ( $R^1$ ) unida al anillo BL, y algunos grupos como las cefalosporinas, carbapenamas y cefamas contienen otra cadena lateral ( $R^2$ ) unida al anillo no BL. Las diferencias que existen en la composición del núcleo y de las cadenas laterales de los distintos antibióticos BLs, en mayor o menor medida, son suficientes para que sean reconocidos como estructuras diferentes por el SI, y este hecho tiene consecuencias clínicas relevantes.

Debido a las similitudes y diferencias entre las estructuras químicas de los diferentes BLs, dentro de las reacciones alérgicas se puede diferenciar entre pacientes que reaccionan frente a varios BLs pertenecientes al mismo grupo y que se diagnostican como pacientes con reactividad cruzada frente a un grupo de antibióticos BLs, y pacientes que reaccionan únicamente frente a una estructura BL y que toleran hasta dosis terapéuticas la administración del resto de BLs de su grupo, en cuyo caso se diagnostican como pacientes selectivos a un antibiótico BL concreto.



**Figura 17:** Estructura química general de las penicilinas y de las cefalosporinas.

**Tabla 1:** Clasificación y estructura química de los antibióticos BLs.

GRUPO	ESTRUCTURA QUÍMICA
<b>Penicilinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo: Ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) formado por la yuxtaposición de un anillo BL y un anillo de tiazolidina.</li> <li>- Cadena lateral (R): Una cadena lateral unida al anillo BL en posición 6.</li> </ul> 
<b>Cefalosporinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo: Ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) formado por un anillo BL unido a un anillo de dihidrotiacina.</li> <li>- Cadena lateral (R): Dos cadenas laterales (R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>). Cadena lateral R<sup>1</sup> unida al anillo BL en posición 7 y cadena lateral R<sup>2</sup> en posición 3 del anillo de dihidrotiacina.</li> </ul> 

GRUPO	ESTRUCTURA QUÍMICA
<b>Carbapenamas</b> - Núcleo: Derivado del 6-APA, pero carece de átomo de azufre en posición 1 del anillo de tiazolidina y en su lugar posee un átomo de carbono. - Cadena lateral (R): Dos cadenas laterales ( $R^1$ y $R^2$ ). Cadena lateral $R^1$ unida al anillo BL en posición 6 y cadena lateral $R^2$ en posición 2 del anillo pentamérico.	
<b>Cefamas</b> - Núcleo: Derivado del 7-ACA, pero carece del átomo de azufre en posición 1 del anillo de dihidrotiacina y en su lugar posee un átomo de oxígeno. - Cadena lateral (R): Dos cadenas laterales ( $R^1$ y $R^2$ ). Cadena lateral $R^1$ unida al anillo BL en posición 7 y cadena lateral $R^2$ en posición 3 del anillo hexamérico.	
<b>Clavamas</b> - Núcleo: Derivado del 6-APA, pero el anillo BL está unido a un anillo de oxazolidina en lugar de a uno de tiazolidina. - Cadena lateral (R): Carece de cadena lateral.	
<b>Monobactamas</b> - Núcleo: Compuesto por un anillo BL. - Cadena lateral (R): Una cadena lateral unida al anillo BL en posición 4.	

### a) Penicilinas

Las penicilinas constituyen el grupo más importante de antibióticos BLs y son la primera elección en el tratamiento de muchas infecciones (Damaso *et al.*, 1984a). Son antibióticos de corto, medio y amplio espectro de acción y uno de los grupos de antibióticos menos tóxicos para el organismo. Existe una gran variedad de penicilinas que difieren en la estructura química de su cadena lateral, la cual determina el espectro antibacteriano, la sensibilidad a betalactamasas y la estabilidad a pH ácido de la molécula. Dentro de este grupo podemos distinguir entre penicilinas naturales y semisintéticas, cuya clasificación y estructura química se detallan en las tablas 2-3.



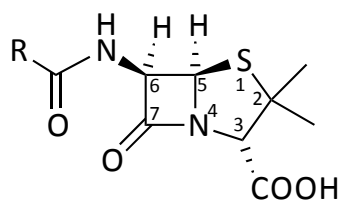
Las penicilinas naturales son aquellas que se obtienen directamente a partir del cultivo de *Penicillium* (en sus inicios *Penicillium notatum* y más tarde *P. chrysogenum*) y son la penicilina G y la penicilina V. La penicilina G o BP tiene como cadena lateral ácido fenilacético y es el derivado de penicilina más sencillo. En el caso de la penicilina V o fenoximetilpenicilina la cadena lateral es el ácido 2-fenoxilacético que le confiere la propiedad de ser estable en medio ácido, con lo que aventaja a la penicilina G en que se puede administrar por vía oral (Tabla 3).

Las penicilinas semisintéticas aparecieron después del desarrollo de la BP ante la necesidad de mejorar la absorción oral y hacer frente a la aparición de resistencias bacterianas inducidas por betalactamasas. Estas penicilinas se obtienen por la adición de distintas cadenas laterales, estructuradas por síntesis química, al grupo NH<sub>2</sub> del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) obtenido a partir de la penicilina G o V.

GRUPO		COMPUESTO
Penicilinas naturales		Penicilina G Penicilina V
Penicilinas semisintéticas	Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina Bacampicilina
	Resistentes a betalactamasas	Cloxacilina Dicloxacilina Flucloxacilina Meticilina Nafcilina Oxacilina
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina Ticarcilina
	Acilaminopenicilinas	Azlocilina Mezlocilina Piperacilina

**Tabla 2:** Clasificación de las penicilinas.

## PENICILINAS

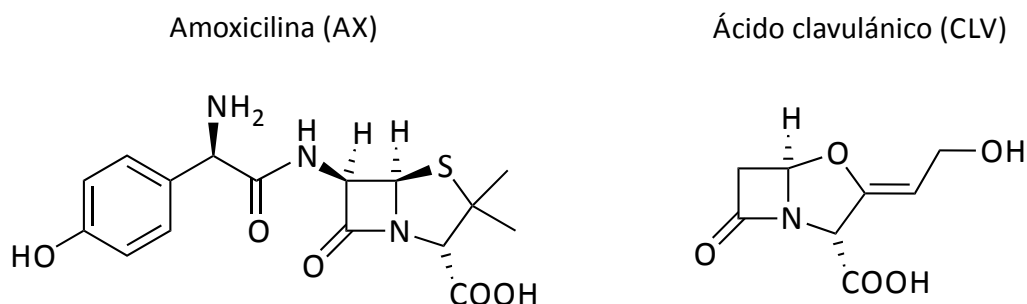


	R	Compuesto	R	Compuesto
Penicilinas naturales		Penicilina G o Bencilpenicilina		Penicilina V
Penicilinas semisintéticas		Amoxicilina		Flucloxacilina
		Ampicilina		Meticilina
		Carbenicilina		Oxacilidina
		Cloxacilina		Piperacilina
		Dicloxacilina		Ticarclina

**Tabla 3:** Estructura química de las penicilinas más comunes.

Dentro de las penicilinas semisintéticas es importante destacar a la AX, ya que en la actualidad es el antibiótico con un mayor consumo en España. La AX es un antibiótico de amplio espectro, cuya actividad antibacteriana comprende bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *Escherichia coli*, algunas cepas de *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* y los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Sin embargo, este antibiótico no es estable frente a las betalactamasas, por lo que no puede usarse en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias productoras de las mismas. Desde la introducción de la AX en el año 1972, la resistencia de algunas bacterias a estos antibióticos ha aumentado, tanto a nivel hospitalario como extrahospitalario y este hecho ha llevado a los investigadores a buscar la forma de mantener activo el antibiótico combinándolo con un inhibidor de las enzimas que producen su inactivación. De este modo surgió la combinación de la AX con el CLV (Figura 18), que comenzó a comercializarse en el año 1981.

El CLV pertenece al grupo de las clavamas y es un potente inhibidor de las betalactamasas generadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, inhibiendo principalmente a las penicilinasas (Sabath, 1984; Neu *et al.*, 1993), sin embargo su actividad bactericida es débil. Su capacidad inhibitoria reside en la presencia del anillo BL en su estructura química, lo que le permite interactuar con las betalactamasas. Para ejercer su acción inhibitoria, el CLV se une de forma covalente al centro catalítico de las betalactamasas dando lugar a un compuesto inactivo. Esta acción inhibitoria es de tipo progresivo e irreversible, por lo que concentraciones pequeñas de CLV pueden impedir la inactivación de penicilinas no resistentes (Damaso *et al.*, 1984b). Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que esta asociación fortalece la acción bactericida de la AX y amplía su espectro de acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo bacterias resistentes a la AX por la expresión de betalactamasas (Weber *et al.*, 1984).



**Figura 18:** Estructura química de la amoxicilina (AX) y del ácido clavulánico (CLV).

b) Cefalosporinas

Las cefalosporinas son antibióticos con un espectro de acción más amplio que el de las penicilinas y son más resistentes a las betalactamasas, pero algunas de ellas son más tóxicas para el organismo (de Weck, 1983b). Son el tratamiento de elección en la profilaxis quirúrgica y en las infecciones comunitarias graves.

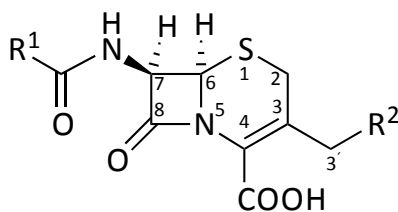
Desde el punto de vista clínico, las cefalosporinas se clasifican según su desarrollo histórico y algunas características microbiológicas y estructurales comunes. Esta clasificación establece cuatro generaciones de cefalosporinas (Tabla 4) (Torres y Blanca, 2010), dentro de las que las cefalosporinas que se encuentran en fase de desarrollo se incluyen en la cuarta generación.

GENERACIÓN	COMPUESTO		
1ª generación	Cefadroxilo Cefalexina Cefalotina	Cefapirina Cefazolina	Cefprocilo Cefradina
2ª generación	Cefaclor Cefamandol Cefmetazol Cefminox	Cefonicid Ceforanida Cefotetán Cefotiam	Cefoxitina Cefuroxima Loracarbacef
3ª generación	Cefdinir Cefetamet Cefixima Cefodizima Cefoperazona	Cefotaxima Cefpiramida Cefpodoxima Cefsulodina	Ceftacidima Ceftibuteno Ceftizoxima Ceftriaxona
4ª generación	Cefepima	Cefpiroma	

**Tabla 4:** Clasificación de las cefalosporinas.

La estructura de la cadena lateral  $R^1$  de las cefalosporinas de primera y segunda generación se diseñó siguiendo la experiencia adquirida con las penicilinas e incluye cadenas laterales de tiazolil y fenilglicil; sin embargo, la cadena lateral  $R^1$  de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación es una estructura de aminotiazol-oxima junto a algunas sales derivadas de ácidos carboxílicos que permiten la penetración a través de la pared celular de las bacterias Gram negativas (Tabla 5). Existe una variedad más amplia en la estructura química de la cadena lateral  $R^2$  y algunas de las estructuras contienen grupos aminos cargados positivamente que afectan a las propiedades farmacológicas y antibacterianas de la cefalosporina.

## CEFALOSPORINAS



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Compuesto
1ª generación		—H	Cefadroxilo			Cefalotina
		—H	Cefalexina			Cefprocilo
2ª generación		—Cl (3')	Cefaclor			Cefonocid
			Cefamandol			Cefuroxima
3ª generación			Cefodizima		—H (3')	Ceftizoxima
			Cefotaxima			Ceftriaxona
4ª generación			Cefepima			

**Tabla 5:** Estructura química de las cefalosporinas más comunes.

#### 4.2.3. Antibióticos betalactámicos como haptenos

Los antibióticos BLs son estructuras de bajo peso molecular que actúan como haptenos en el reconocimiento por el SI, por lo que es necesario que se unan a estructuras macromoleculares para poder inducir una respuesta inmunológica (Eisen *et al.*, 1952).

Todos los BLs son químicamente reactivos sin necesidad de un proceso metabólico previo y tienen la capacidad de unirse de forma espontánea a proteínas exógenas o endógenas que pueden ser procesadas y reconocidas por el SI (Levine y Ovary, 1961; Dewdney, 1977). La principal vía por la que estos antibióticos se unen covalentemente a las proteínas es mediante el ataque nucleofílico del anillo BL a través de un grupo amino libre de los residuos aminoacídicos de la proteína, formándose un enlace tipo amida entre el grupo carbonilo del anillo BL abierto y el grupo amino libre de la proteína (Figura 19).

El grado de haptenización de las proteínas por antibióticos BLs depende de la concentración del hapteno (Warbrick *et al.*, 1995) y hay estudios que indican que la cinética de unión varía entre proteínas de distinta naturaleza, siendo más rápida en proteínas séricas que en proteínas celulares (Warbrick *et al.*, 1995).

#### **4.2.4. Penicilinas como haptenos**

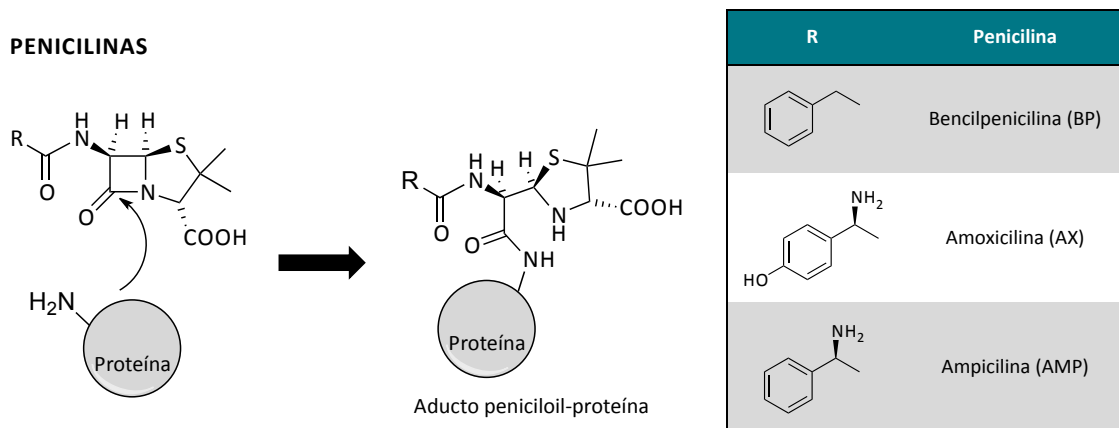
Las penicilinas son los antibióticos BLs mejor estudiados y dentro de este grupo, la BP fue el primer hapteno del que se estudió su inmunoquímica en detalle y que tradicionalmente ha sido considerado como el hapteno modelo para el estudio de las reacciones alérgicas a fármacos.

##### **a) Determinantes antigénicos**

Las penicilinas son moléculas reactivas frente a una amplia variedad de compuestos nucleófilos, y como consecuencia de su alta reactividad y de distintos procesos metabólicos se generan diferentes metabolitos en condiciones fisiológicas que pueden ser reconocidos por el SI (Levine, 1976; Dewdney, 1977; Parker, 1980; de Weck, 1983b). Estos metabolitos se pueden formar y acumular en viales en los que las penicilinas estén preparadas en solución o generarse *in vivo* tras su administración en el organismo.

En diferentes trabajos de investigación realizados durante más de 30 años (Levine, 1976; Parker, 1980; de Weck, 1983b; Edwards y Aronson, 2000) se han identificado varios determinantes antigénicos de las penicilinas en función de modificaciones en su estructura química y en el punto de unión a proteínas portadoras. Durante muchos años, el determinante antigénico mejor conocido ha sido el bencilpeniciloil (BPO), que se forma por la unión del grupo carbonilo resultante de la apertura nucleofílica del anillo BL con un grupo amino libre de una proteína (Levine y Ovary, 1961; Dewdney, 1977). Debido a que alrededor del 95% de

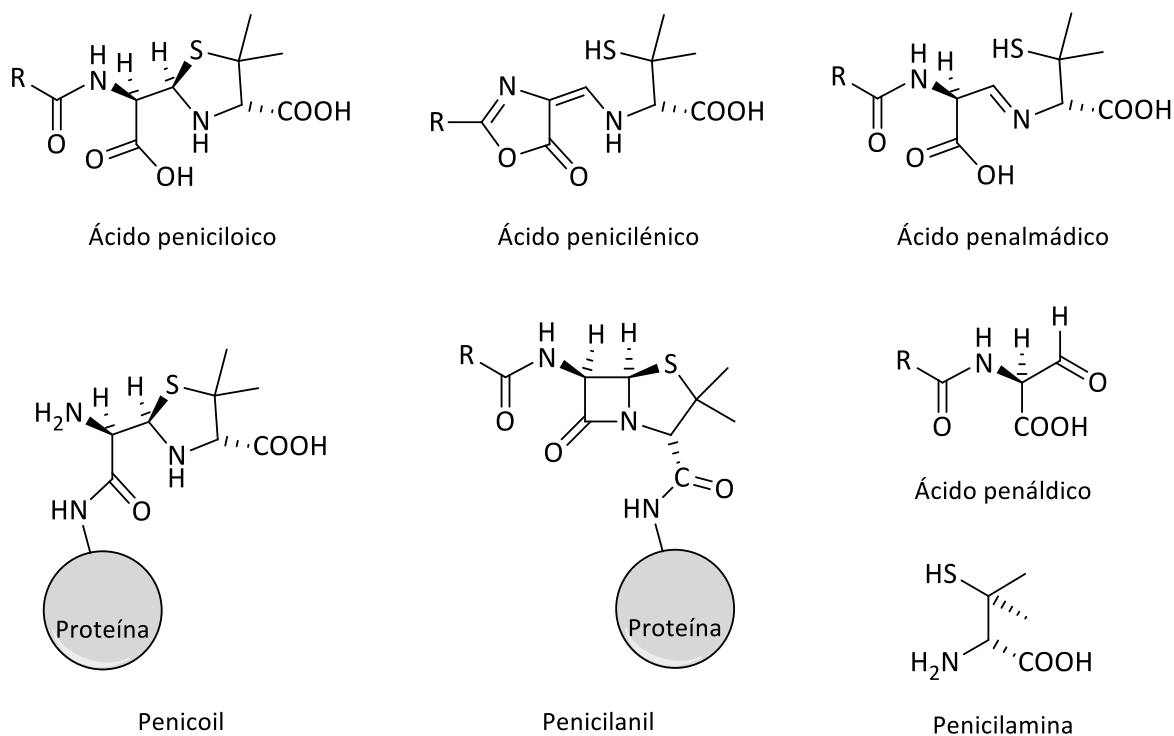
las moléculas de penicilina se unen de este modo a proteínas en condiciones fisiológicas, el BPO se conoce como el determinante mayor de la BP. El mismo proceso de formación del determinante BPO se ha observado con la AX y la AMP para la formación de amoxiciloil (AXO) y ampiciloil (APO) como determinantes mayores (Figura 19), y por extensión se asume que estos determinantes se pueden generar con el resto de penicilinas.



**Figura 19: Mecanismo de formación del determinante antigénico peniciloil.** Según la naturaleza de la cadena lateral (R) de la estructura general de las penicilinas nos referimos a los determinantes mayores bencilpeniciloil (BPO), amoxiciloil (AXO) y ampiciloil (APO).

El metabolismo de las penicilinas genera otros determinantes antigénicos que representan sólo el 5% del total de los metabolitos y que reciben el nombre de determinantes menores (Dewdney, 1977). Entre estos últimos se pueden mencionar el ácido peniciloico, peniclenato, penicilanil, penamaldato, penaldato, d-penicilamida y penicoil (Dewdney, 1977) (Figura 20), aunque todavía no se ha demostrado la participación directa de algunos de estos determinantes en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (de Weck, 1983b; Baldo y Harle, 1990) ni su relevancia clínica y no hay estudios inmunoquímicos detallados que prueben su existencia en humanos (Levine y Ovary, 1961; Gueant *et al.*, 2006), además pueden existir otros determinantes menores de estructura aún desconocida. El término de determinante menor sólo hace referencia a la abundancia con la que aparece y no a la importancia clínica o inmunológica en el desarrollo de las reacciones alérgicas (Sullivan, 1988), ya que se ha podido confirmar que se producen con mucha frecuencia reacciones inmediatas en respuesta a alguno de los determinantes menores de las penicilinas (Levine, 1966; Levine y Redmond, 1969) y que están asociados a manifestaciones clínicas graves de tipo anafiláctico

(Gorevic y Levine, 1981). Se han empleado diferentes determinantes antigénicos de penicilinas en la realización de pruebas diagnósticas *in vivo* e *in vitro*, pero los determinantes empleados y los resultados obtenidos no son equivalentes en cada una de estas pruebas.

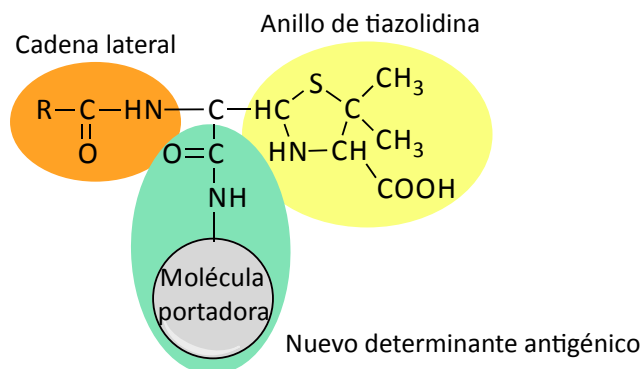


**Figura 20:** Estructura química de los determinantes menores de las penicilinas.

A partir de la obtención de anticuerpos frente a penicilinas empleando como inmunógeno el fármaco conjugado a una macromolécula portadora se ha observado que tanto la naturaleza de la molécula portadora (Blanca *et al.*, 1992) como la del hapteno (Blanca *et al.*, 1991) puede influir en el reconocimiento y en la unión de los anticuerpos IgE a esta estructura inmunogénica. Mediante el uso de anticuerpos policlonales de conejo (Brandriss *et al.*, 1965; Atsumi *et al.*, 1967; Girard, 1968) y monoclonales de ratón (de Haan *et al.*, 1985; Fukushima *et al.*, 1987) se ha observado que estos anticuerpos reconocen tres regiones principales que se han identificado como epítomos de la molécula de penicilina y que corresponden con el anillo de tiazolidina, la cadena lateral y la región formada por la unión del grupo carbonilo del anillo BL abierto a un grupo amino libre de una proteína, que se conoce como nuevo determinante antigénico (de Haan *et al.*, 1985) (Figura 21). Estos primeros estudios descritos para la determinación de los epítomos se realizaron con BP, y posteriormente se obtuvieron resultados similares con otras moléculas como la AMP (Girard, 1968; Nagakura *et al.*, 1991) y la AX (Mayorga *et*



*al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1995), pudiendo hacer extensible estos tres epítomos identificados a todo el grupo de las penicilinas. Además, estos resultados también se pudieron observar en trabajos realizados con anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a las penicilinas (Van Dellen *et al.*, 1971; Blanca *et al.*, 1988; Harle y Baldo, 1990; Blanca *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1995).



**Figura 21:** Determinantes antigénicos comunes de las penicilinas. Imagen tomada de de Haan (de Haan *et al.*, 1985).

A continuación se detallan las características de estos tres epítomos (Figura 21) capaces de ser reconocidos específicamente por diferentes anticuerpos anti-penicilina, si bien se debe destacar que en todos los casos es necesaria la estructura completa de molécula de la penicilina para poder ser reconocida de forma óptima por el anticuerpo.

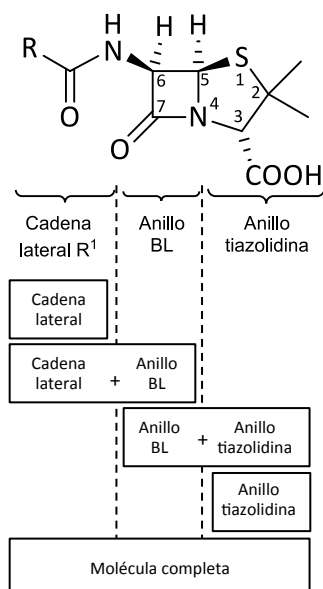
- **Anillo de tiazolidina:** Estructura química común para todas las penicilinas. Se pudo demostrar que era uno de los epítomos porque determinados anticuerpos eran capaces de reconocer del mismo modo a diferentes penicilinas independientemente de la estructura química de su cadena lateral y de que estuvieran unidas o no a una molécula portadora (de Haan *et al.*, 1985).

- **Cadena lateral:** Estructura química que diferencia a las distintas penicilinas y que determina el reconocimiento específico de las mismas (de Haan y van Ketel, 1987). Después de diversos estudios se ha aceptado la importancia de la cadena lateral como determinante antigénico, particularmente en las reacciones de hipersensibilidad a AX (Blanca *et al.*, 1990; Romano *et al.*, 1997b; Romano *et al.*, 2000; Blanca *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2005).

- **Nuevo determinante antigénico:** Estructura química formada por la unión del grupo carbonilo resultante de la apertura nucleofílica del anillo BL con un grupo amino libre de un aminoácido, generalmente lisina, de una proteína (Rubin,

1972). La existencia de este nuevo determinante antigénico se demostró tras observar que la penicilina conjugada a una proteína portadora era reconocida por anticuerpos monoclonales que no la reconocían o la reconocían en menor grado cuando se empleaba en su forma libre (Rubin, 1972).

En un estudio detallado para analizar el reconocimiento de la estructura de los antibióticos BLs por anticuerpos monoclonales (Mayorga *et al.*, 1995) se observaron varios patrones de reconocimiento de estos anticuerpos, que se podían agrupar en anticuerpos selectivos frente a la cadena lateral, anticuerpos que reconocían de forma selectiva la cadena lateral y parte de la región nuclear, anticuerpos que reconocían la cadena lateral con reactividad cruzada con la de otras penicilinas y cefalosporinas y anticuerpos que reconocían la región nuclear del antibiótico (Figura 22).



**Figura 22:** Regiones de la molécula de las penicilinas que pueden ser reconocidas por anticuerpos anti-penicilina. Imagen tomada de Baldo *et al.*, 2001 (Baldo *et al.*, 2001).

#### b) Importancia de la estructura de la cadena lateral de las penicilinas

El papel y la relevancia de la cadena lateral de las penicilinas como determinante antigénico se manifiesta particularmente en las reacciones alérgicas selectivas, que empezaron a describirse tras la aparición de las penicilinas semisintéticas con el diagnóstico de pacientes alérgicos a la AX que toleraban la administración de BP hasta dosis terapéuticas. Estos estudios clínicos demostraron que la AX tenía capacidad de inducir reacciones selectivas gracias a la relevancia de la estructura química de su cadena lateral (Blanca *et al.*, 1990; Romano *et al.*, 1997b;

Romano *et al.*, 2000; Blanca *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2005; Torres y Blanca, 2006b). El hecho de que la cadena lateral sea diferente en los distintos tipos de penicilinas hace que cualquiera de estos compuestos pueda generar epítomos específicos (Nagakura *et al.*, 1990; Nagakura *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1992; Mayorga *et al.*, 1995) y sea capaz de inducir una respuesta selectiva. En la actualidad se ha podido demostrar la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a diferentes antibióticos BLs (Romano *et al.*, 2000).

Por otro lado, como consecuencia de la similitud entre las estructuras químicas de todos los antibióticos BLs, se ha demostrado que existe reactividad cruzada entre distintos grupos de BLs, como sucede entre las penicilinas y las cefalosporinas, y esta reactividad cruzada aumenta en los casos en los que las penicilinas y las cefalosporinas comparten la misma cadena lateral (Miranda *et al.*, 1996).

#### c) Haptenización de proteínas séricas y celulares por penicilinas

Las características de las respuestas inmunológicas que se desencadenan frente a las penicilinas pueden estar relacionadas con diferentes aspectos del proceso de formación de los aductos inmunogénicos, de la naturaleza del propio aducto y de las características de su captación, procesamiento y presentación por las CPA (DiPiro *et al.*, 1993).

Se han realizado algunos estudios enfocados en la caracterización de los aductos inmunogénicos formados por la unión de penicilinas a moléculas portadoras, la capacidad de estos aductos de activar el SI y la relevancia inmunopatogénica de los mismos, pero una de las principales dificultades de estos estudios son las limitaciones que existen en la detección de los aductos generados *in vivo* en organismos tratados con fármacos. Los primeros estudios se realizaron mediante ensayos de modificación *in vitro* de proteínas portadoras por BP en condiciones de pH alcalino para favorecer la generación de los aductos fármaco-proteína (Levine, 1962) porque en condiciones fisiológicas la formación de estos aductos es más lenta y su detección es más complicada. Este hecho plantea dudas sobre cómo se produce la conjugación *in vivo* y cuáles son los mecanismos de amplificación por los que se pueden desencadenar reacciones alérgicas en un corto espacio de tiempo desde la administración del fármaco y con manifestaciones clínicas de cierta gravedad.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, tradicionalmente la HSA se ha considerado la principal proteína diana de los procesos de haptización por penicilinas, y por ello la mayoría de los estudios se han centrado en la caracterización de los aductos peniciloil-HSA. Hasta el momento se ha observado que el número de moléculas de BP que se unen covalentemente a la HSA es directamente proporcional a la concentración del fármaco empleada, que la detección de grupos peniciloil disminuye de forma exponencial a lo largo del tiempo tras la interrupción del tratamiento y que la vida media de la HSA peniciloilada es más corta o igual que la de la HSA sin modificar (Lafaye y Lapresle, 1988). Con respecto a los estudios encaminados a la detección e identificación de los residuos de la HSA modificados por antibióticos BLs hay que destacar los primeros estudios realizados por Yvon *et al.* en los que se detectaron aductos BPO-HSA en muestras séricas de pacientes tratados con BP o en muestras generadas *in vitro*, y en los que se pudo observar la unión de grupos BPO en 6 de las 59 lisinas de la HSA (Lys 190, 195, 199, 432, 541 y 545) mediante el empleo de técnicas de separación de péptidos tripsinizados por HPLC y la secuenciación de péptidos mediante degradación de Edman (Yvon *et al.*, 1989; Yvon *et al.*, 1990). Recientemente se ha caracterizado la modificación de la HSA por flucloxacilina (Jenkins *et al.*, 2009), piperacilina (Whitaker *et al.*, 2011) y BP (Meng *et al.*, 2011) mediante ensayos de espectrometría de masas en tándem acoplados a un sistema de cromatografía líquida (LC-MS/MS) realizados con muestras séricas de pacientes sometidos a tratamientos prolongados con estos fármacos y con muestras obtenidas en ensayos de modificación *in vitro*. A partir de estos últimos trabajos se han podido detectar aductos de HSA con los tres fármacos estudiados y se han identificado los principales residuos de la HSA a los que se unen cada uno de los fármacos, siendo la Lys 190 y 212 para la flucloxacilina, la Lys 541 para la piperacilina y Lys 199 para la BP. No se conocen todos los factores que determinan los residuos aminoacídicos que sufren una modificación por fármacos, pero es posible que la unión con la lisina esté favorecida por la presencia de una serina cercana en la cadena polipeptídica o en la configuración terciaria de la proteína (Yvon *et al.*, 1989; Yvon *et al.*, 1990).

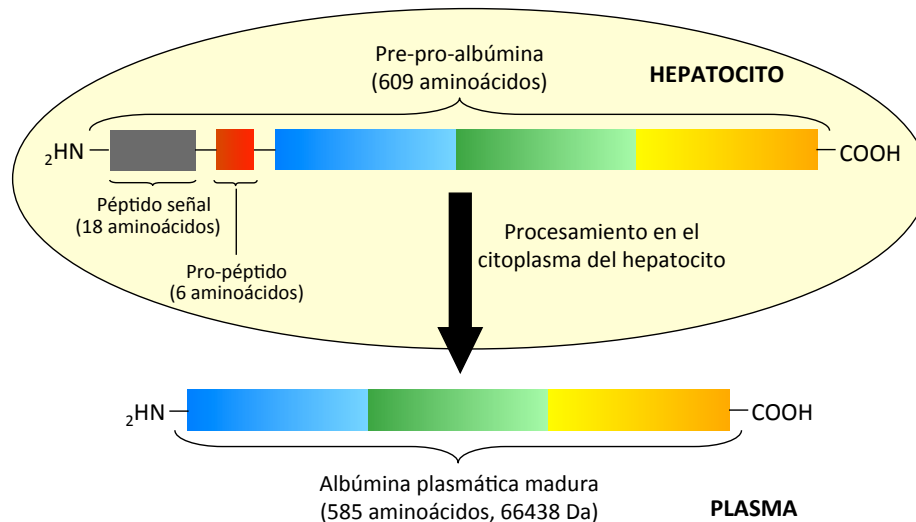
Además de la HSA existen otras proteínas séricas y celulares que pueden intervenir en los procesos de haptización y en la inducción de las respuestas inmunológicas, pero todavía se conoce muy poco sobre su naturaleza y sobre el papel que desempeñan en el desarrollo de las respuestas de hipersensibilidad. En un

trabajo realizado por Lafaye *et al.* con muestras de sangre de pacientes tratados con BP se detectaron grupos peniciloil en una fracción de proteínas séricas en la que se había eliminado la HSA, pero no se identificaron las proteínas modificadas (Lafaye y Lapresle, 1988). Posteriormente, mediante electroforesis bidimensional y detección inmunológica, se identificó a la HSA y a la transferrina como proteínas modificadas en plasma de sujetos tratados con AMP (Magi *et al.*, 1995). También se han realizado algunos trabajos para estudiar la formación de determinantes antigénicos con proteínas celulares y se ha comprobado que derivados de la BP tienen capacidad de unirse a las membranas de los macrófagos (Binderup y Arrigoni-Martelli, 1979; O'Donnell *et al.*, 1991) y de los monocitos (Watanabe *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1987) y que la formación de estos determinantes antigénicos es relativamente más lenta con proteínas celulares que con proteínas séricas (Warbrick *et al.*, 1995).

- **Albúmina sérica humana como proteína portadora**

La HSA es la proteína más abundante en el plasma y representa el principal determinante de la presión oncótica plasmática y el modulador más importante de la distribución de fluidos entre los compartimentos corporales (Peters, 1996; Evans, 2002; Mendez *et al.*, 2005). Esta proteína tiene una extraordinaria capacidad de unión a ligandos, actuando como reservorio y vehículo para muchos compuestos endógenos y exógenos (Fasano *et al.*, 2005) entre los que se incluyen una gran variedad de fármacos. La HSA es el principal transportador de ácidos grasos, interviene en la farmacocinética de muchos fármacos, proporciona modificación metabólica para algunos ligandos, representa la mayor capacidad antioxidante del plasma humano y tiene propiedades enzimáticas. Además, la HSA se usa como biomarcador de muchas enfermedades y como vehículo de otras moléculas para fines clínicos, biofísicos e industriales (Fasano *et al.*, 2005, Ahmed-Ouameur *et al.*, 2006; Ascenzi *et al.*, 2006; Varshney *et al.*, 2010; Ascenzi y Fasano, 2010).

La biosíntesis de la HSA comienza en el hepatocito con la producción de la pre-pro-albúmina que consiste en una cadena polipeptídica de 609 aminoácidos con un pro-péptido de 6 aminoácidos en el extremo N-terminal precedido de un péptido señal de 18 aminoácidos (Figura 23). Ambos péptidos se eliminan durante el procesamiento de la proteína en el citoplasma del hepatocito hasta obtener la proteína plasmática madura formada por una única cadena de 585 aminoácidos, con un peso molecular de 66438 Da (Peters, 1996) y con una vida media de 28-36 días.



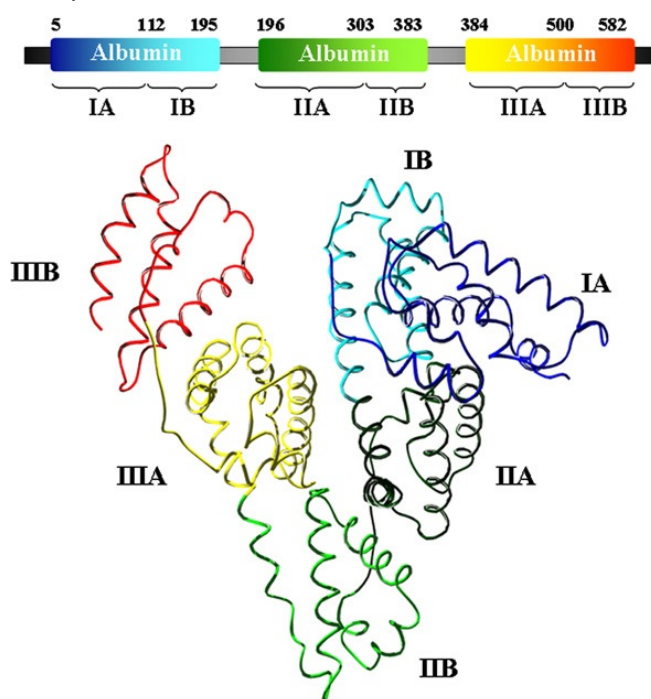
**Figura 23:** Esquema de la estructura de la cadena polipeptídica de la pre-pro-albúmina biosintetizada en los hepatocitos y de la albúmina plasmática madura.

Los residuos aminoacídicos más abundantes en la HSA son la alanina, el ácido glutámico, la leucina y la lisina. Esta proteína tiene un elevado número de residuos ionizados que determinan su carga total y que favorecen su solubilidad. Los residuos de naturaleza ácida superan en número a los de naturaleza básica, teniendo una carga neta negativa por molécula de -15 a pH 7,0. Hay que destacar que la HSA contiene 35 residuos de cisteína que forman 17 puentes disulfuro, con un único residuo libre de cisteína localizado en la posición 34 que es muy importante en la función antioxidante de la HSA. Los puentes disulfuro contribuyen de forma significativa a la estabilidad de la HSA y determinan su larga vida media (Peters, 1996).

La estructura secundaria de la HSA está formada principalmente por hélices alfa (68%) y no posee ninguna lámina beta. La HSA tiene una conformación globular en forma de corazón con unas dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å (Sugio *et al.*, 1999) y está constituida por tres dominios homólogos denominados I (1-195), II (196-383) y III (384-585) que son comparables en la secuencia de aminoácidos y en la estructura terciaria y secundaria (Curry, 2002; Curry, 2009; Ascenzi y Fasano, 2010; Varshney *et al.*, 2010). Cada dominio está formado por 10 hélices alfa y están empaquetados en dos subdominios separados (A y B) formados respectivamente por 6 y 4 hélices alfa. A pesar de la similitud estructural, cada dominio interactúa con el dominio adyacente de distinta manera por lo que la orientación de los dominios I-II con respecto a los dominios II-III constituye un entorno muy asimétrico en el que

se localizan una gran variedad de sitios de unión a ligandos (Curry *et al.*, 1998; Sugio *et al.*, 1999; Ascenzi y Fasano, 2010) (Figura 24).

La estructura de la HSA está sometida a transiciones conformacionales en diferentes condiciones de pH debido al elevado número de residuos ácidos y básicos de su secuencia. A pH inferior a 2,7 adopta una conformación extendida; a pH comprendido entre 2,7 y 4,3 adquiere una conformación de migración rápida, que se caracteriza por un aumento de su viscosidad, una menor solubilidad y la pérdida de hélices alfa con respecto a las condiciones fisiológicas; a pH comprendido entre 4,3 y 8,0 presenta su forma neutra caracterizada por la estructura en forma de corazón, y finalmente a pH superior a 8,0 la HSA cambia su conformación a la forma básica caracterizada por la pérdida de hélices alfa y un aumento de la afinidad por algunos ligandos con respecto a la forma neutra (Peters, 1996; van der Vusse, 2009; Ascenzi y Fasano, 2010).



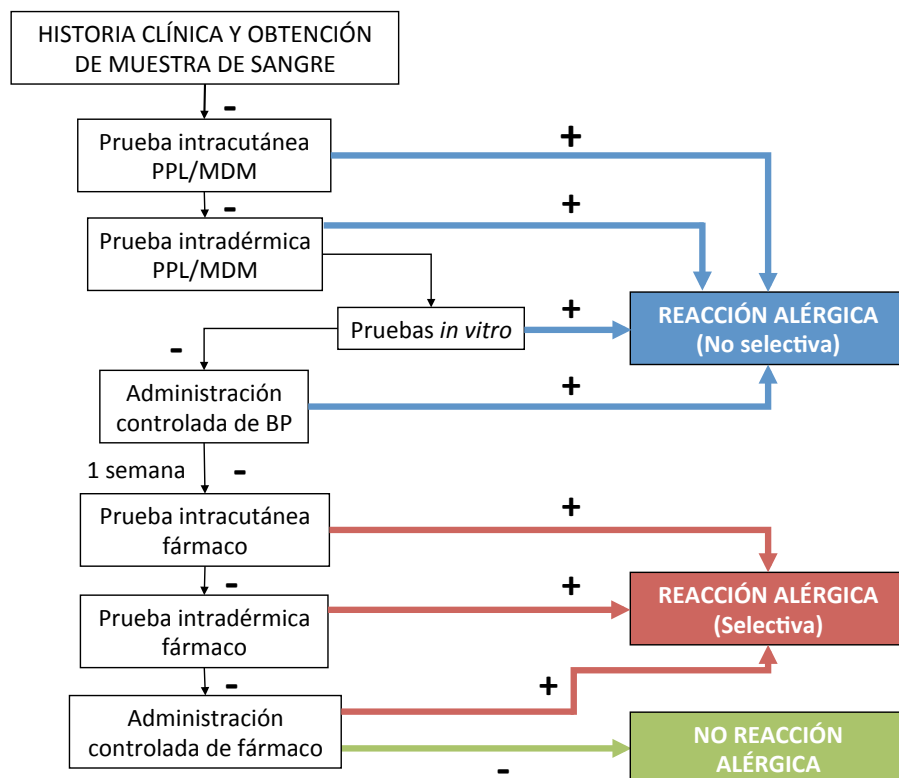
**Figura 24: Organización en dominios de la estructura de la HSA.** En el panel superior se muestra la estructura de la secuencia de la albúmina sérica, con tres dominios conservados, según lo asignado por el NCBI (código de entrada cd00015). En el panel inferior se muestra la estructura tridimensional de la HSA con los subdominios representados en diferentes colores, las coordenadas atómicas se han tomado del PDB (código de entrada 1AO6). Imagen tomada de Sugio *et al.*, 1999 y Guex y Peitsch, 1997.

La HSA puede sufrir varias modificaciones químicas durante sus larga vida media que pueden afectar a sus propiedades antioxidantes y de unión a ligandos, y que además le pueden conferir propiedades antigénicas (Honma *et al.*, 1991; Peters,

1996; Roche *et al.*, 2008). Entre estas modificaciones químicas se encuentran la acetilación, cisteinilación, homocisteinilación, nitrosilación, nitración, oxidación, fosforilación, glutathionilación y glicación.

### 4.3. Métodos diagnósticos

La aproximación general para la evaluación y el diagnóstico de sujetos que han sufrido una reacción de hipersensibilidad inmediata tras las administración de antibióticos BLs se ha descrito por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) (Torres *et al.*, 2003). El algoritmo diagnóstico propuesto comprende la realización de una historia clínica plausible y de diferentes pruebas diagnósticas entre las que se incluyen las pruebas cutáneas, inmunoensayos, ensayos celulares y la administración controlada del fármaco (Figura 25).



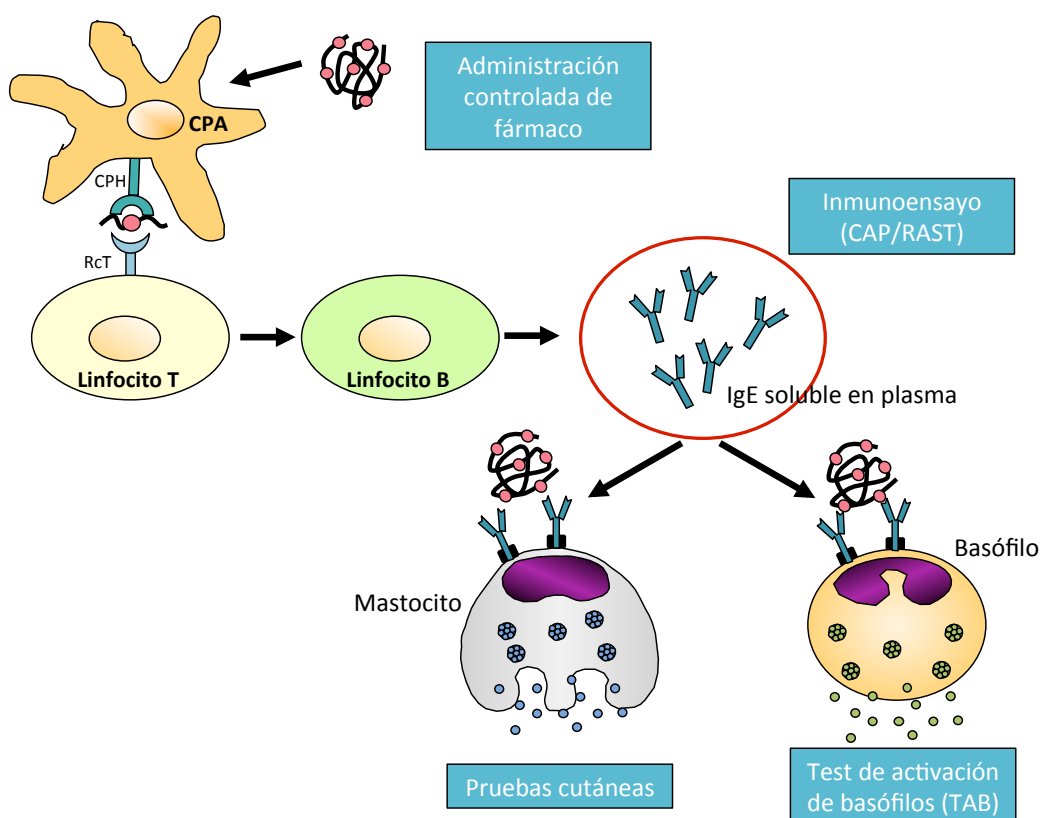
**Figura 25:** Algoritmo diagnóstico para la evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs.

El primer paso para realizar un diagnóstico clínico correcto es establecer una historia clínica plausible, en la que los síntomas descritos tienen que ser compatibles con este tipo de reacciones y aparecer en un intervalo de tiempo inferior a 1 hora tras la administración del fármaco. Éste es un aspecto muy importante porque muchas de las variaciones detectadas entre diferentes estudios clínicos están



relacionadas con la selección de los pacientes, con la falta de diferenciación entre reacciones inmediatas y no inmediatas e incluso con errores en la clasificación. La información que se debe incluir en la historia clínica y que es necesaria para establecer un diagnóstico fiable comprende los siguientes aspectos: síntomas inducidos, fármaco o fármacos implicados, intervalo de tiempo transcurrido entre la toma del fármaco y la aparición de los síntomas, intervalo de tiempo transcurrido entre la aparición de la reacción y la evaluación del sujeto, episodios previos, tolerancia a otros fármacos y procesos infecciosos por los que han sido administrados los antibióticos BLs.

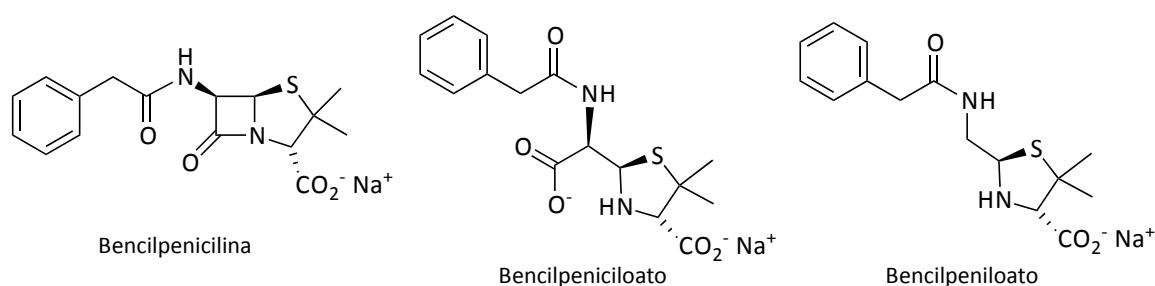
El siguiente paso para establecer el diagnóstico clínico de estas reacciones es la realización de diferentes pruebas diagnósticas destinadas a comprobar la activación de los mastocitos tisulares mediante pruebas cutáneas y de los basófilos circulantes mediante ensayos celulares, determinar los niveles de IgE sérica mediante inmunoensayos y confirmar el diagnóstico mediante la administración controlada del fármaco (Figura 26).



**Figura 26:** Métodos diagnósticos para la evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs.

### 4.3.1. Pruebas cutáneas

El diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs se basa principalmente en la realización de pruebas cutáneas. Debido a que durante muchos años la BP ha sido el fármaco más relevante implicado en este tipo de reacciones (Blanca *et al.*, 1994b), el diagnóstico se ha centrado en el uso de los determinantes mayores y menores de la BP (Matheu *et al.*, 2005; Bousquet *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2009; Blanca *et al.*, 2009). El determinante mayor de la BP empleado en las pruebas cutáneas es la peniciloil-polilisina (PPL) que está formado por la BP conjugada a poli-L-lisina (PLL) (Levine y Ovary, 1961). Los determinantes menores que se emplean de forma rutinaria en las pruebas cutáneas se han comercializado como mezcla de determinantes menores (MDM) (Rodríguez-Bada *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010), que es una mezcla de BP, bencilpeniciloato y bencilpeniloato (Parker *et al.*, 1962; Levine y Redmond, 1969) (Figura 27).



**Figura 27:** Mezcla de determinantes menores (MDM).

Desde finales de la década de los 80 numerosos estudios mostraron que la AX era el fármaco implicado con mayor frecuencia en las reacciones alérgicas inmediatas ya que era el fármaco al que estaba expuesto un mayor número de personas desplazando progresivamente a la BP. Este hecho provocó una disminución significativa en la sensibilidad de las pruebas cutáneas realizadas con determinantes de la BP (PPL y MDM) e hizo necesario incluir la AX en las pruebas cutáneas (Blanca *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2001; Blanca *et al.*, 2007).

A partir de estas observaciones, la Red Europea de Alergia a Fármacos (ENDA) recomendó la realización de las pruebas cutáneas con PPL, MDM y AX (Weiss y Adkinson, 1988; Blanca *et al.*, 1990; Silviu-Dan *et al.*, 1993) y en los casos con resultados negativos a PPL y MDM también se deben realizar estas pruebas con BP. Además, en sujetos que han sufrido una reacción a la combinación de AX-CLV y que muestran resultados negativos para PPL, MDM y AX, se deben realizar la pruebas

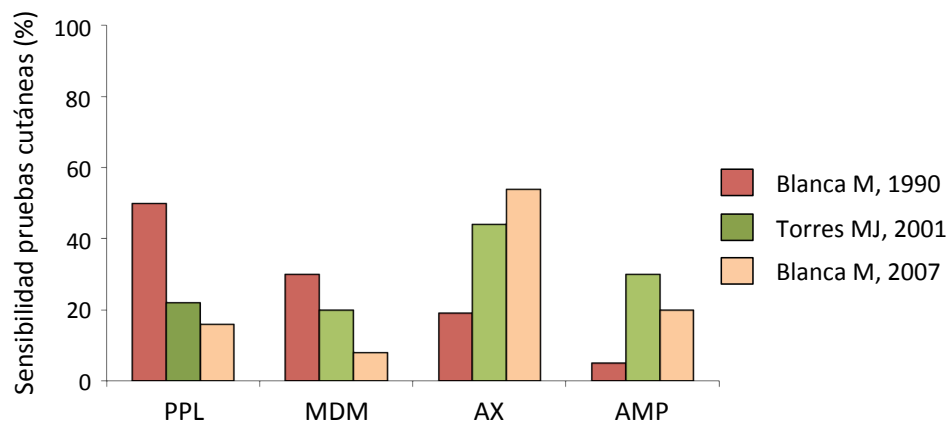
cutáneas con AX-CLV porque el CLV no está disponible comercialmente para su uso en humanos sin combinar con la AX.

Dentro de las pruebas cutáneas se realizan pruebas intracutáneas (o prick) e intradérmicas. Se recomienda realizar primero las pruebas intracutáneas y si los resultados obtenidos son negativos realizar las intradérmicas. En la tabla 6 se detalla la dosis recomendada para cada uno de los reactivos empleados en estas pruebas, pero en casos particularmente graves se debe reducir la concentración del fármaco hasta 1000 veces como medida de precaución.

Reactivo	Concentración
PPL	$5 \times 10^{-5}$ mmol/l
MDM	$2 \times 10^{-2}$ mmol/l
BP	10.000 UI/ml
AX	20 mg/ml
AMP	20 mg/ml
Cefalosporinas	2 mg/ml

**Tabla 6:** Reactivos y concentraciones máximas recomendadas para la realización de las pruebas cutáneas.

Con respecto a la sensibilidad y a la especificidad, el porcentaje de resultados positivos puede variar a lo largo del tiempo y al comparar diferentes poblaciones. En un estudio realizado con una misma población en diferentes años, el 77,7% de los pacientes evaluados tenían pruebas cutáneas con resultados positivos para PPL y/o MDM (Blanca *et al.*, 1990), y con el paso del tiempo este porcentaje descendió hasta el 42,1% y 22,1% (Torres *et al.*, 2001). La disminución en la sensibilidad de las pruebas cutáneas realizadas con PPL y MDM se ha compensado progresivamente con la inclusión de la AX pero sigue sin ser óptima, no alcanzando valores superiores al 70% (Torres *et al.*, 2001; Blanca *et al.*, 2007) (Figura 28). Sin embargo, la especificidad de las pruebas cutáneas para estos haptenos no ha variado a lo largo del tiempo y se sitúa alrededor del 97%.



**Figura 28:** Variación de la sensibilidad de las pruebas cutáneas realizadas con determinantes BLs a lo largo del tiempo.

#### 4.3.2. Pruebas *in vitro*

##### a) Inmunoensayos

Los inmunoensayos son los métodos que se emplean en la detección de anticuerpos IgE específicos frente a BLs. En estos ensayos se usa una fase sólida (sefarosa, discos de celulosa) a la que está unida una molécula portadora (PLL, HSA, aminoespaciadores), a la que se conjuga el antibiótico BL de interés (BP, AX y cefalosporinas) (Blanca *et al.* 1992; Garcia *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2003).

En los análisis de rutina se emplea una plataforma comercial de fluoroinmunoensayo ("CAP System FEIA method", Phadia) que cuenta con una fase sólida de alta capacidad de superficie donde el hapteno está unido mediante un espaciador. La cuantificación de los anticuerpos IgE específicos con este método abarca valores comprendidos entre 0,01-100 kUA/l ("A" representa anticuerpos específicos frente al antígeno), con un valor de corte de 0,35 KUA/l para los resultados positivos, y donde valores superiores a 0,10 kUA/l son indicativos de la sensibilización del individuo. La especificidad de este método está comprendida entre el 83,3% y el 100% y la sensibilidad entre el 12,5% y el 45%, en función de las manifestaciones clínicas y de los resultados de las pruebas cutáneas (Blanca *et al.*, 2001). Existen estudios recientes que muestran una tendencia general a la disminución de la sensibilidad de esta técnica, posiblemente relacionada con la relevancia que están adquiriendo nuevas estructuras BLs en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (Macy *et al.*, 2010).

En algunos laboratorios también se realiza un radioinmunoensayo (RIA) no comercial para la determinación de anticuerpos IgE específicos conocido como

prueba radioalergoabsorbente (RAST). En este método se emplean como fase sólida discos de celulosa activados con bromuro de cianógeno a los que se une una molécula portadora conjugada con el hapteno de interés. Los valores de especificidad del RAST están comprendidos entre el 80-95% (Torres *et al.*, 2001) y los de sensibilidad se sitúan alrededor del 50% (Torres *et al.*, 2001; Blanca *et al.*, 2009). Con objeto de mejorar la sensibilidad de estas pruebas se están realizando estudios centrados en el empleo de estructuras dendriméricas como moléculas portadoras a las que se conjugan antibióticos BLs, entre los que hay trabajos en los que se han empleado nanoconjugados formados por dendrímeros de poliaminoamida (PAMAM) unidos a BP (Montañez *et al.*, 2008) o trabajos en los que se ha analizado la posibilidad de incluir espaciadores para aumentar la distancia entre los nanoconjugados y la fase sólida o el empleo de nuevas fases sólidas diferentes a los tradicionales discos de celulosa (Ruiz-Sanchez *et al.*, 2012).

#### b) Ensayos celulares

El test de activación de basófilos (TAB) es un ensayo celular cuyo uso está aumentando de forma progresiva en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas. Se basa en la capacidad de los basófilos activados de expresar en su superficie marcadores de activación tales como el CD63 o el CD203c, que pueden ser detectados mediante citometría de flujo.

Este método tiene una sensibilidad del 48,6% y una especificidad del 93% con los antibióticos BLs (Sanz *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2004). Se ha observado que la sensibilidad de este ensayo es mayor cuando se emplean como reactivos haptenos sin conjugar previamente a una molécula portadora (Torres *et al.*, 2004), aunque todavía no se conoce bien el mecanismo por el que estos haptenos interaccionan con las moléculas de IgE específica unidas a la superficie de los basófilos para desencadenar su activación.

#### **4.3.3. Administración controlada de fármaco**

Las pruebas de administración controlada de fármaco sólo se pueden realizar en pacientes con pruebas cutáneas y pruebas *in vitro* negativas, que no presenten ningún factor de riesgo y en los sea imprescindible obtener un diagnóstico confirmado (Bousquet *et al.*, 2008).

Es una prueba a simple ciego controlada con placebo y se realiza bajo una estricta supervisión hospitalaria y con acceso a una sala de emergencias (Torres *et*

*al.*, 2003; Blanca *et al.*, 2009). La administración del fármaco se realiza a dosis crecientes hasta alcanzar la dosis terapéutica, con un intervalo mínimo de tiempo de 30 a 60 minutos entre cada administración. La dosis recomendada de cada fármaco para la realización de esta prueba se muestra en la tabla 7, pero en el caso de pacientes que hayan sufrido una reacción grave la dosis inicial del fármaco debe ser inferior.

Estudios recientes muestran que debido a que la sensibilidad de las pruebas cutáneas y de los métodos *in vitro* no es óptima, más del 30% de los pacientes con reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs no podrán ser diagnosticados correctamente si no se someten a una administración controlada de fármaco (Bousquet, 2008).

Reactivo	Concentración
BP	$10^3, 10^4, 10^5, 5 \times 10^{-5}$ UI/ml Dosis acumulada $6 \times 10^{-5}$ UI/ml
AX	5, 50, 100, 150, 200 mg Dosis acumulada (500 mg)
AMP	5, 50, 100, 150, 200 mg Dosis acumulada (500 mg)
Cefalosporinas	5, 50, 100, 150, 200 mg Dosis acumulada (500 mg)

**Tabla 7:** Reactivos y concentraciones recomendadas en la administración controlada del fármaco.

#### 4.3.4. Comparación entre diferentes métodos diagnósticos

Los métodos diagnósticos descritos se pueden considerar generalmente complementarios o en algunos casos alternativos, como es el caso de las pruebas *in vitro* como primera elección diagnóstica en pacientes que han sufrido una reacción grave. Diferentes estudios realizados a lo largo de los años han mostrado una concordancia variable entre las pruebas cutáneas y las pruebas *in vitro*.

En antiguos trabajos realizados por Kraft *et al.* (Kraft y Wide, 1976; Kraft *et al.*, 1977; Kraft *et al.*, 1981) y Basomba *et al.* (Basomba *et al.*, 1979) se encontró una buena correlación entre las pruebas cutáneas y el RAST a BP, pero en los casos en los que las pruebas cutáneas sólo eran positivas a los determinantes menores de la BP los resultados eran variables. En estudios comparativos posteriores en los que se emplearon en los inmunoensayos PLL y aminoespaciadores como moléculas

portadoras se siguió detectando una buena correlación entre las pruebas *in vitro* y las pruebas cutáneas (Blanca *et al.*, 1992; Blanca *et al.*, 1994a), siendo la sensibilidad de las pruebas cutáneas superior a la de las pruebas *in vitro*. Sin embargo, hay estudios más recientes en los que se ha podido observar un número considerable de pacientes con una historia clínica de alergia a penicilinas con pruebas cutáneas negativas y pruebas *in vitro* positivas, a pesar de que la sensibilidad de las pruebas *in vitro* es generalmente inferior (Torres *et al.*, 2002; Gamboa *et al.*, 2004).

Con respecto al TAB, en un estudio multicéntrico realizado por el grupo ENDA (de Weck *et al.*, 2006) se observó que en pacientes con una historia clínica de reacción alérgica a BLs y pruebas cutáneas positivas, sólo el 48-51% de los casos tenían un TAB con resultados positivos y una determinación de IgE específica positiva en el 38% de los casos.

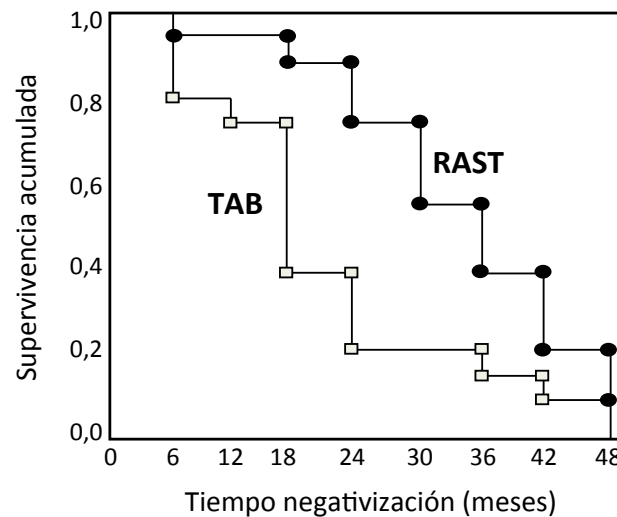
Aunque las pruebas diagnósticas *in vitro* aportan información diagnóstica útil y complementaria, las pruebas cutáneas siguen siendo la primera elección diagnóstica a menos que estén contraindicadas por las características del paciente.

#### **4.3.5. Evolución a lo largo del tiempo**

Cuando se desarrolla una reacción alérgica inmediata se produce un aumento en los niveles de los anticuerpos IgE, pero se ha observado que estos elevados niveles de IgE persisten en el organismo durante un breve período de tiempo en comparación con los de IgG (Dessein *et al.*, 1980). Este hecho determina que el intervalo de tiempo transcurrido entre el episodio alérgico y la evaluación diagnóstica del paciente sea un factor muy importante en los resultados obtenidos y en la interpretación de los mismos, y que se traduce en una disminución de la sensibilidad de los métodos diagnósticos con el transcurso del tiempo desde el último episodio alérgico del paciente.

Existen estudios en los que se ha realizado un seguimiento a lo largo del tiempo de los resultados de las pruebas cutáneas y de los niveles de IgE específica en pacientes alérgicos a antibióticos BLs, en los que se ha observado una tendencia a la negativización de los resultados que es más pronunciada en aquellos pacientes con una reacción selectiva en comparación con los pacientes alérgicos con reactividad cruzada entre varios fármacos (Posadas *et al.*, 1997; Blanca *et al.*, 1999; Fernandez *et al.* 2009). Según estos trabajos, el 50% de las pruebas cutáneas positivas a AX se negativizaban después de 3 años y el 100% después de 5 años (Blanca *et al.*, 1999); mientras que en el caso de las pruebas cutáneas positivas a

determinantes de BP, el 50% de los pacientes seguían teniendo resultados positivos después de 5 años. Los resultados de las pruebas *in vitro* también seguían esta tendencia, detectándose una negativización más rápida de los resultados del TAB en comparación con los del RAST (Fernandez *et al.*, 2009) (Figura 29).



**Figura 29:** Comparación del análisis de supervivencia del RAST y del TAB durante un período de seguimiento de 4 años. Imagen tomada de Fernandez *et al.*, 2009.



## **II. Justificación e hipótesis**



Las reacciones alérgicas a fármacos constituyen un problema sanitario de relevancia, afectan a un porcentaje significativo de la población expuesta y suponen una importante sobrecarga para los servicios sanitarios públicos (Thong *et al.*, 2003; Gomes y Demoly, 2005). En España existen unidades especializadas en los servicios de alergología con una gran experiencia en la evaluación de este tipo de reacciones. En los últimos 6 años se ha evaluado a 5.000 pacientes con una posible historia clínica de alergia a fármacos en el Servicio de Alergología del Hospital Carlos Haya de Málaga, de los que finalmente el 37% tuvieron un diagnóstico confirmado de alergia a fármacos (Doña *et al.*, 2012), datos que coinciden con los obtenidos en otros estudios realizados con pacientes hospitalizados (Sastre *et al.*, 2012).

El diagnóstico de una reacción alérgica a fármacos conlleva la utilización de medicación alternativa, en muchos casos menos eficaz, más tóxica y más cara (Sastre *et al.*, 2012); además el uso de antibióticos alternativos que no son de primera elección para el tratamiento de determinados procesos infecciosos conlleva un aumento del riesgo de sufrir infecciones por microorganismos resistentes (Lee *et al.*, 2000). Por ello es de gran importancia realizar un correcto diagnóstico de este tipo de reacciones para aumentar la seguridad de los pacientes en futuros tratamientos farmacológicos y conseguir un ahorro económico para el sistema sanitario.

Las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs son las reacciones de hipersensibilidad más frecuentes mediadas por un mecanismo inmunológico específico y su abordaje diagnóstico es complejo y está basado en la realización de pruebas cutáneas, que carecen de una sensibilidad óptima, y de la administración controlada de fármacos (Torres y Blanca, 2010; Demoly *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2012). Estas pruebas diagnósticas no están exentas de riesgo para el paciente por lo que para su realización es necesario personal sanitario entrenado y tener acceso a una sala de emergencias. Debido a que no se dispone de ningún método diagnóstico *in vitro* con la suficiente sensibilidad para reemplazar a las pruebas cutáneas en la práctica clínica diaria, el coste económico de la evaluación de estos pacientes es excesivo para los sistemas sanitarios, siendo prioritario el desarrollo de métodos *in vitro* con una sensibilidad y una especificidad óptimas que permitan realizar un diagnóstico rápido, no invasivo, ambulatorio, menos costoso y exento de riesgo para el paciente.

Los hábitos de prescripción de los antibióticos BLs están sometidos a cambios a lo largo del tiempo conforme aparecen nuevos antibióticos más eficaces y esto se traduce en modificaciones en la frecuencia de las reacciones alérgicas inducidas por los diferentes fármacos. De este modo, la BP ya no es el antibiótico que se prescribe con mayor frecuencia sino que ha sido sustituido de forma progresiva por la AX a la que están expuestas millones de personas en todo el mundo (Torres *et al.*, 2001; Bousquet *et al.*, 2005; Torres y Blanca, 2006a) y en los últimos años la combinación AX-CLV es la que está experimentando un mayor crecimiento en su consumo. Estos cambios en los patrones de consumo y por tanto en los patrones de exposición y sensibilización ha provocado que en las últimas décadas se haya producido una disminución significativa (del 77,7% al 22,1%) en la sensibilidad de las pruebas cutáneas con determinantes de la BP (PPL y MDM) (Blanca *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2001; Bousquet *et al.*, 2005), lo que ha obligado a incluir la AX en la batería de haptenos para poder diagnosticar las reacciones selectivas a AX (Blanca *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de la inclusión de la AX, la sensibilidad de las pruebas cutáneas no alcanza valores superiores al 70% (Torres *et al.*, 2001; Blanca *et al.*, 2009) y los resultados descritos en las pruebas de diagnóstico *in vitro* son similares, donde la sensibilidad de los inmunoensayos no supera el 50% (Blanca *et al.*, 2009).

Para poder mejorar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas es necesario avanzar en el conocimiento de los determinantes antigénicos generados a partir de los antibióticos BLs que son reconocidos por los anticuerpos IgE específicos, concretamente es importante analizar la relevancia de diferentes derivados de la AX, al ser el antibiótico al que en la actualidad están expuestas un mayor número de personas. Hay que señalar que el aumento que ha experimentado en los últimos años el consumo de la combinación AX-CLV (Longo *et al.*, 2008; Sanchez-Morillas *et al.*, 2010) ha ocasionado un incremento del número de pacientes que acuden a los servicios de alergología con una reacción tras la administración de AX-CLV pero que toleran la AX hasta dosis terapéuticas (Kamphof *et al.*, 2002; Raison-Peyron *et al.*, 2003; Gonzalez de Olano *et al.*, 2007; Tortajada *et al.*, 2008). Debido a que el metabolismo del CLV y sus derivados no están relacionados químicamente con los de la BP ni la AX y los resultados de estudios que mostraban que el CLV generaba metabolitos inestables con baja capacidad inmunogénica (Edwards *et al.*, 1988) hicieron que se asumiera que el CLV no podía inducir reacciones alérgicas, pero los casos clínicos descritos en los últimos años han puesto de manifiesto la existencia de

reacciones alérgicas selectivas a CLV, aunque su diagnóstico es difícil porque en estos momentos no se dispone de ningún preparado comercial que contenga CLV sin combinar con otros fármacos para la realización de pruebas cutáneas, ni existen técnicas *in vitro* para la detección de IgE específica frente a CLV. Esto hace necesaria la caracterización de las reacciones alérgicas inmediatas a CLV y la identificación de la estructura química que es reconocida por los anticuerpos IgE para poder incluir el CLV en la batería de haptenos que se emplea en las pruebas cutáneas y en los métodos diagnósticos *in vitro* en previsión del posible aumento en el número de reacciones alérgicas a CLV que se producirá en los próximos años.

La capacidad de los antibióticos BLs para inducir reacciones alérgicas reside en su propiedad de unirse covalentemente a macromoléculas que actúan como portadoras junto con las que forman aductos inmunogénicos. Este fenómeno es complejo y se desconocen los derivados de los BLs que finalmente interaccionan con las macromoléculas, la identidad y la función inmunológica de estas macromoléculas y el modo en el que el SI procesa estos aductos para presentarlos a los linfocitos y desencadenar una respuesta mediada por IgE. Todos estos aspectos pueden ser relevantes en el proceso de sensibilización y en la susceptibilidad de ciertos individuos a padecer un cuadro de hipersensibilidad, por lo que identificación de las proteínas que intervienen en los procesos de haptenización y la caracterización de los aductos resultantes pueden contribuir a la mejora de las pruebas diagnósticas.

La HSA es la proteína más estudiada hasta el momento como molécula portadora de los procesos de haptenización, pero la información de la que se dispone con respecto a su modificación por penicilinas es escasa, con resultados publicados hace muchos años (Lafaye y Lapresle, 1987; Lafaye y Lapresle, 1988; Yvon y Wal, 1988; Yvon *et al.*, 1989; Yvon *et al.*, 1990; Carter y Ho, 1994) y algunos estudios realizados recientemente con análisis mediante espectrometría de masas (Jenkins *et al.* 2009; Whitaker *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011), pero no se ha caracterizado la modificación por AX.

Hay pocos trabajos centrados en la detección e identificación de otras proteínas séricas y celulares capaces de formar aductos con los antibióticos BLs (Christie y Park, 1989; O'Donnell *et al.*, 1991; DiPiro *et al.*, 1993; Magi *et al.*, 1995; Warbrick *et al.*, 1995) y es importante profundizar en este aspecto porque a pesar de que la HSA es la proteína más abundante en el plasma puede que no sea la proteína que sufra un mayor grado de modificación o la que tenga una mayor

capacidad inmunogénica, sino que pueden existir otras proteínas plasmáticas o celulares más relevantes como portadoras del hapteno. También es importante considerar la posible influencia de determinadas condiciones fisiopatológicas sobre el proceso de haptización y las propiedades inmunogénicas de los aductos generados.

En resumen, en este trabajo estudiaremos dos aspectos fundamentales para tratar de profundizar en la identificación y en la caracterización de los determinantes antigénicos de antibióticos BLs y sus proteínas portadoras como aspecto fundamental para el estudio de su implicación en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad. Nos centraremos en la determinación de los determinantes antigénicos de los BLs a los que están expuestos un mayor número de personas en la actualidad, para lo que analizaremos la relevancia de varios determinantes menores de la AX en las pruebas diagnósticas y valoraremos la capacidad del CLV para inducir reacciones de hipersensibilidad tras la administración de AX-CLV mediante la realización de pruebas diagnósticas con el CLV suministrado por una casa comercial para este estudio. Por otro lado analizaremos la contribución de las macromoléculas portadoras en la formación de los determinantes antigénicos identificando proteínas endógenas que pueden intervenir en los procesos de haptización y caracterizando los aductos fármaco-proteína mediante la optimización de métodos inmunológicos y proteómicos. Estas aproximaciones aportarán información útil para conseguir mejorar en un futuro los métodos diagnósticos gracias al empleo de nuevos determinantes BLs y moléculas portadoras, porque la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos actuales parece indicar que no se están empleando las estructuras que originalmente indujeron la sensibilización del paciente. Además, los procedimientos optimizados y la información adquirida se podrán aplicar posteriormente a otras estructuras BLs implicadas en reacciones de hipersensibilidad inmediata.

### **III. Objetivos**

---





## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo consiste en la caracterización de la estructura de los determinantes antigénicos implicados en el desarrollo de reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs. Se pretende analizar la relevancia que tiene la estructura química del antibiótico BL y la naturaleza de las macromoléculas portadoras que intervienen en los procesos de haptización en la conformación de estos determinantes antigénicos y en su reconocimiento por el SI. En este trabajo se toma como modelo la molécula de AX porque es el antibiótico BL que actualmente induce con mayor frecuencia reacciones alérgicas y la molécula de CLV debido a que el consumo de la combinación AX-CLV está aumentando progresivamente y en los próximos años será el medicamento al que estará expuesta la mayor parte de la población.

## OBJETIVOS CONCRETOS

1. Identificar los determinantes de la AX más relevantes implicados en la sensibilización de pacientes que han sufrido una reacción alérgica inmediata a la AX.
  - 1.1. Evaluar el empleo de determinantes menores de la AX (ácido amoxiciloico y dicetopiperacina) en pruebas cutáneas y métodos diagnósticos *in vitro* para aumentar su sensibilidad.
  - 1.2. Evaluar el grado de reconocimiento de determinantes menores de la AX (ácido amoxiciloico y dicetopiperacina) por anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a la AX.
2. Evaluar la capacidad del CLV de inducir reacciones alérgicas inmediatas en personas que han sufrido una reacción tras la administración de AX-CLV.
  - 2.1. Determinar el porcentaje de reacciones alérgicas inmediatas tras la administración de AX-CLV asociadas al reconocimiento selectivo del CLV.
  - 2.2. Evaluar la relevancia de las pruebas cutáneas y del TAB en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a CLV.
  - 2.3. Demostrar la participación de anticuerpos IgE específicos frente a CLV en las reacciones alérgicas inmediatas a CLV.

3. Determinar la relevancia de moléculas portadoras haptenizadas por AX en el reconocimiento del fármaco por anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a la AX.
  - 3.1. Comparar el grado de reconocimiento de la AX conjugada a diferentes estructuras moleculares por anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a la AX y analizar la posible existencia de diferentes patrones de reconocimiento.
4. Detectar e identificar proteínas séricas y celulares haptenizadas por AX y caracterizar los aductos AX-proteína.
  - 4.1. Desarrollar abordajes inmunoquímicos y proteómicos para la detección de proteínas séricas y celulares modificadas *in vitro* por AX.
  - 4.2. Identificar proteínas séricas modificadas *in vitro* por AX.
  - 4.3. Analizar el efecto de agentes oxidantes en la modificación *in vitro* de proteínas séricas por AX.
  - 4.4. Caracterizar la modificación de HSA por AX *in vitro* e identificar los sitios de modificación.
  - 4.5. Identificar proteínas celulares modificadas por AX.

## **IV. Material y métodos**



## 1. Identificación de determinantes antigénicos de antibióticos betalactámicos reconocidos por anticuerpos IgE específicos

Se realizaron varios estudios para la identificación de determinantes antigénicos de antibióticos BLs reconocidos por los anticuerpos IgE específicos de pacientes que habían sufrido una reacción de hipersensibilidad inmediata a estos fármacos:

- A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX.
- B. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV.
- C. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX.

### 1.1. Ámbito de estudio

El trabajo experimental que a continuación de detalla se realizó en el Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A. y la selección y evaluación de pacientes en el Servicio de Alergología del Hospital Carlos Haya de Málaga y de otros hospitales españoles (Tabla 8).

A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX		
Trabajo experimental	Selección y evaluación de pacientes	Período tiempo
Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A.	Servicio de Alergología: - Hospital Carlos Haya de Málaga - Hospital de Elche, Alicante - Hospital de Salamanca - Hospital de la Cruz Roja, Madrid	2008 – 2009

B. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV		
Trabajo experimental	Selección y evaluación de pacientes	Período tiempo
Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A.	Servicio de Alergología del Hospital Carlos Haya de Málaga	2006 – 2009

C. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX		
Trabajo experimental	Selección y evaluación de pacientes	Período tiempo
Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya de Málaga – I.B.I.M.A.	Servicio de Alergología del Hospital Carlos Haya de Málaga	2008-2011

**Tabla 8:** Ámbito de estudio de la selección y evaluación de los pacientes incluidos en los diferentes estudios.

## 1.2. Selección de pacientes y controles

En los diferentes estudios se incluyeron pacientes que habían sido diagnosticados de sufrir una reacción alérgica inmediata a AX o AX-CLV (Tabla 9), considerando como reacciones inmediatas aquellas que aparecieron en un intervalo de tiempo inferior a 1 hora tras la administración del fármaco. Se establecieron dos categorías clínicas: anafilaxia y urticaria (Torres *et al.*, 2003); el criterio para considerar una reacción como anafilaxia fue la existencia de una reacción alérgica sistémica de acuerdo a los criterios descritos por Sampson *et al.* (Sampson *et al.*, 2006), y dentro de las reacciones de urticaria se incluyeron las manifestaciones clínicas limitadas exclusivamente a la piel y que consistían en maculopápulas asociadas o no con angioedema.

Los criterios de inclusión para los pacientes de los diferentes estudios fueron los siguientes:

- Tener una edad superior a 14 años.
- Tener un diagnóstico de reacción alérgica inmediata a AX o AX-CLV.
- No encontrarse en estado de gestación o lactancia.
- No padecer una enfermedad inmunológica u oncológica ni una patología cutánea.
- No tomar corticoides, antihistamínicos u otros agentes inmunomoduladores en el momento del estudio.
- Dar consentimiento informado para su inclusión en el estudio.
- Tener la posibilidad de acudir a las revisiones periódicas del estudio.

El protocolo diagnóstico se realizó de acuerdo con los algoritmos diagnósticos definidos por el grupo ENDA (Torres *et al.*, 2003; Blanca *et al.*, 2009). Se realizó una historia clínica detallada donde se recogió el fármaco implicado, el tipo de reacción, el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración del fármaco y el

desarrollo de los síntomas y el intervalo de tiempo transcurrido entre la reacción y el estudio alérgico. Se realizaron pruebas intracutáneas con determinantes mayores y menores de la BP (PPL y MDM), AX, AX-CLV y CLV; y si en estas pruebas se obtenían resultados negativos se realizaban las pruebas intradérmicas con los mismos haptenos. En los casos en los que todas las pruebas cutáneas fueron negativas se confirmó el diagnóstico mediante la administración controlada del fármaco.

En el grupo control de los diferentes estudios se incluyeron 30 individuos sanos no alérgicos, que habían tomado AX o AX-CLV con buena tolerancia. Los sujetos tenían pruebas cutáneas negativas a determinantes mayores y menores de la BP (PPL y MDM), AX, AX-CLV y CLV y buena tolerancia a AX o AX-CLV que se comprobó en la consulta médica.

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético de los hospitales participantes y se obtuvieron los consentimientos informados de los pacientes y los controles para todos los procedimientos diagnósticos realizados.

A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX	
Criterios de inclusión	
<b>Pacientes</b>	Reacción alérgica inmediata tras la administración de AX o AX-CLV
<b>Controles</b>	Administración previa de AX o AX-CLV Pruebas cutáneas negativas a BP, PPL, MDM y AX Buena tolerancia a AX comprobada en consulta

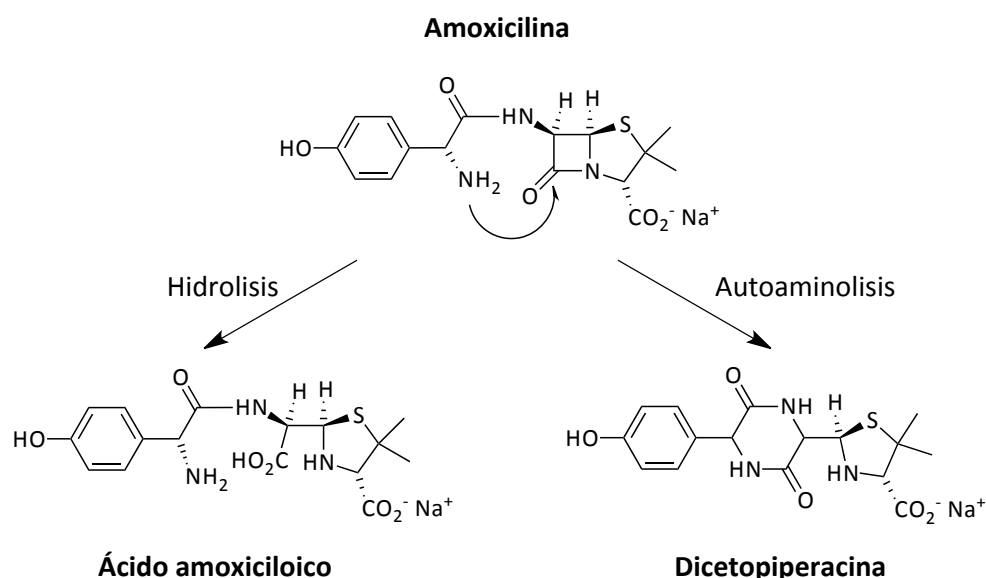
B. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV	
Criterios de inclusión	
<b>Pacientes</b>	Reacción alérgica inmediata tras la administración de AX-CLV Pruebas cutáneas positivas a BP, PPL, MDM, AX, AX-CLV o CLV
<b>Controles</b>	Administración previa de AX-CLV Pruebas cutáneas negativas a BP, PPL, MDM, AX, AX-CLV y CLV Buena tolerancia a AX-CLV comprobada en consulta

C. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX	
Criterios de inclusión	
<b>Pacientes</b>	Reacción alérgica inmediata tras la administración de AX o AX-CLV RAST positivo a AXO-PLL superior al 7%
<b>Controles</b>	Administración previa de AX o AX-CLV Pruebas cutáneas negativas a BP, PPL, MDM y AX Buena tolerancia a AX comprobada en consulta

**Tabla 9:** Criterios de inclusión de los pacientes y de los controles de los diferentes estudios.

### 1.3. Obtención de determinantes menores de AX para la realización de ensayos *in vivo* e *in vitro*

Los determinantes menores de la AX (ácido amoxiciloico y dicetopiperacina) se sintetizaron en los Laboratorios Diater para emplearlos en pruebas cutáneas y en pruebas diagnósticas *in vitro* y de este modo analizar su relevancia en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a la AX (Figura 30). El ácido amoxiciloico se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Bousquet *et al.* para la obtención de ácido peniciloico (Bousquet *et al.*, 2005) y la dicetopiperacina se preparó según el protocolo descrito por Llins *et al.* (Llins *et al.*, 1998).



**Figura 30:** Estructura química y ruta de formación de los determinantes menores de AX (ácido amoxiciloico y dicetopiperacina).



El grado de pureza de los compuestos obtenidos se analizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) usando un detector de UV a 276 nm. Para el análisis por HPLC las muestras de AX y ácido amoxiciloico se disolvieron en tampón fosfato salino (PBS) a pH 7 y la dicetopiperacina en PBS:metanol (7:3) a una concentración final de 2 mg/ml y se cargaron en un sistema de HPLC HP-1090 equipado con una columna cromatográfica Kromasil 100 C18 5,0  $\mu$ m (250 x 3 mm) equilibrada previamente con H<sub>2</sub>O/acetonitrilo (95/5 con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%). La elución de las muestras se realizó con un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O/acetonitrilo (con TFA al 0,1%) comenzando por una proporción 95/5 hasta alcanzar una proporción 85/15 en 30 minutos.

#### **1.4. Obtención de conjugados de AX con moléculas portadoras para la realización de ensayos *in vitro***

Los conjugados de AX con HSA se prepararon incubando 50 mg de HSA (Sigma-Aldrich) y 500 mg de AX (Clamoxyl® intramuscular, Glaxo Smithkline) en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 10,2) durante 48 h a 37°C. La AX que no se había unido a la proteína se eliminó mediante filtración en gel con mallas de dextrano Sephadex G-10 (Pharmacia) usando un colector de fracciones (2111 Multrac LKB, Pharmacia) y una bomba peristáltica. La presencia de los conjugados en las distintas fracciones recolectadas se determinó midiendo su absorbancia a 285 nm en un espectrofotómetro. Las alícuotas se concentraron en una centrífuga de vacío y se reconstituyeron en PBS. La cuantificación de la cantidad de proteína de los conjugados reconstituidos se determinó por el método Bradford con Coomassie Blue G-250 (Thermo Scientific) y midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

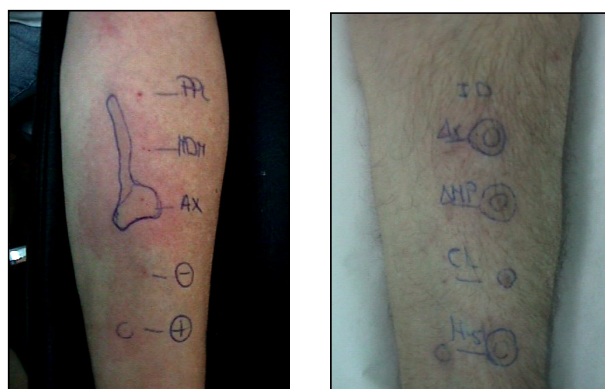
Los conjugados monoméricos de AX con butilamina (BA) se prepararon según la técnica descrita por Mozingo y Folkers (Mozingo y Folkers, 1949). Para ello se disolvió lentamente la AX en una solución de butilamina (BA) 14 M en H<sub>2</sub>O destilada. La solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se liofilizó. Finalmente los conjugados se recrystalizaron en éter-acetonitrilo y se resuspendieron en PBS.

Los conjugados dendriméricos PAMAM-G4-(AXO)<sub>32</sub>(BPO)<sub>32</sub> y PAMAM-G4-(AXO)<sub>64</sub> se sintetizaron por la Dra. María Isabel Montañez en el grupo del Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga.

## 1.5. Pruebas *in vivo*

### 1.5.1. Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas se realizaron siguiendo los procedimientos generales descritos por el grupo ENDA (Torres *et al.*, 2003; Blanca *et al.*, 2009). Para su realización se usaron soluciones preparadas diariamente en suero fisiológico de cada uno de los haptenos a ensayar, los controles positivos y negativos fueron histamina (ALK Abelló) y suero fisiológico (Serra Pamies) respectivamente. En primer lugar se realizaron las pruebas intracutáneas (prick) mediante la aplicación de una gota de la solución del hapteno sobre la piel del antebrazo y el posterior pinchazo con una lanceta. Si el resultado era negativo se realizaban las pruebas intradérmicas, para las que se inyectaban 0,02 - 0,05 ml de la solución del hapteno en el antebrazo, formándose una pápula de la que se marcaba su diámetro inicial (Figura 31).



**Figura 31:** Pruebas cutáneas realizadas para el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs.

En la tabla 10 se recogen los haptenos y las concentraciones que se emplearon en las pruebas intracutáneas e intradérmicas. Siempre se comenzaba con la dosis más baja indicada y si los resultados eran negativos se repetía la prueba con una concentración superior. En el caso de pacientes que habían tenido una reacción grave o que presentaban un riesgo especial, las pruebas cutáneas se realizaron en primer lugar con una dilución 1/1000 de la dosis máxima recomendada y se fue aumentando la concentración de forma gradual hasta obtener una respuesta positiva o alcanzar la concentración máxima recomendada.

La lectura de las pruebas se realizó en la primera media hora. Los criterios por los que se consideraron los resultados positivos fueron los siguientes: en el caso de las pruebas intracutáneas se consideró positivo la aparición de una pápula de un diámetro mayor de 3 mm acompañada de eritema, con una respuesta negativa al

control salino (Brockow *et al.*, 2002); en las pruebas intradérmicas se marcó el área de la pápula al inicio de la prueba y 20 minutos después, considerándose positivo un incremento en el diámetro medio de al menos 3 mm (Brockow *et al.*, 2002). Se hizo una lectura tardía en aquellos casos en los que se desconocía la cronología de la reacción o en los que existían dudas sobre si se trataba de una reacción no inmediata.

A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX		
Reactivo		Concentración
Determinantes clásicos	PPL (Diater)	$5 \times 10^{-5}$ y $5 \times 10^{-4}$ mM
	MDM (Diater)	$2 \times 10^{-2}$ y $2 \times 10$ mM
	BP (Penibiot® vía intravenosa-intramuscular, Normon)	100 y 10.000 UI/ml
	AX (Clamoxyl® intramuscular, Glaxo Smithkline)	2 y 20 mg/ml
Nuevos determinantes	AX (Diater)	1; 5 y 10 mg/ml
	Ácido amoxiciloico (Diater)	1; 5 y 10 mg/ml
	Dicetopiperacina (Diater)	1; 5 y 10 mg/ml

B. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV	
Reactivo	Concentración
PPL (Diater)	$5 \times 10^{-5}$ y $5 \times 10^{-4}$ mM
MDM (Diater)	$2 \times 10^{-2}$ y $2 \times 10$ mM
BP (Penibiot® vía intravenosa-intramuscular, Normon)	100 y 10.000 UI/ml
AX (Clamoxyl® intramuscular, Glaxo Smithkline)	2 y 20 mg/ml
CLV (Diater)	4 y 20 mg/ml
AX-CLV (vía intravenosa, Combino-Pharm)	5/1 y 20/4 mg/ml

C. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX	
Reactivo	Concentración
PPL (Diater)	$5 \times 10^{-5}$ y $5 \times 10^{-4}$ mM
MDM (Diater)	$2 \times 10^{-2}$ y $2 \times 10$ mM
BP (Penibiot® vía intravenosa-intramuscular, Normon)	100 y 10.000 UI/ml
AX (Clamoxyl® intramuscular, Glaxo Smithkline)	2 y 20 mg/ml

**Tabla 10:** Reactivos y concentraciones empleadas en las pruebas cutáneas. La concentración máxima indicada coincide con la concentración máxima recomendada para cada uno de los haptenos.

### 1.5.2. Administración controlada de fármaco

Se realizaron pruebas de administración controlada de fármaco a simple ciego controlada con placebo bajo estricta vigilancia del personal sanitario y con acceso a una sala de emergencias. La prueba consistió en la administración de dosis crecientes del fármaco a intervalos regulares de tiempo de 30-60 minutos hasta alcanzar la dosis terapéutica habitual (Torres *et al.*, 2003; Blanca *et al.*, 2009). Sólo se realizó en pacientes con pruebas cutáneas negativas y que no presentaban ningún factor de riesgo.

El procedimiento a seguir fue el siguiente: tras realizar las pruebas cutáneas con PPL y MDM, si los resultados eran negativos se procedía a la administración parenteral de BP a intervalos regulares de tiempo y dosis crecientes. En una visita posterior, si las pruebas cutáneas con AX también eran negativas, se administraba por vía oral AX a dosis crecientes e intervalos regulares de tiempo, y en el caso del estudio de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV también se administró por vía oral AX-CLV (Tabla 11).

A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX	
Reactivo	Concentración
BP (Normon)	$10^3$ ; $10^4$ ; $10^5$ Y $5 \times 10^5$ UI/ml (dosis acumulada $6 \times 10^5$ UI/ml)
AX (Glaxo Smithkline)	5; 50; 100; 150 y 200 mg (dosis acumulada 500 mg)

B. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV	
Reactivo	Concentración
BP (Normon)	$10^3$ ; $10^4$ ; $10^5$ Y $5 \times 10^5$ UI/ml (dosis acumulada $6 \times 10^5$ UI/ml)
AX (Glaxo Smithkline)	5; 50; 100; 150 y 200 mg (dosis acumulada 500 mg)
AX-CLV (Combino-Pharm)	5; 50; 100; 150 y 200 mg (dosis acumulada 500 mg)

C. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX	
Reactivo	Concentración
BP (Normon)	$10^3$ ; $10^4$ ; $10^5$ Y $5 \times 10^5$ UI/ml (dosis acumulada $6 \times 10^5$ UI/ml)
AX (Glaxo Smithkline)	5; 50; 100; 150 y 200 mg (dosis acumulada 500 mg)

**Tabla 11:** Reactivos y concentraciones empleadas en la administración controlada de fármaco.

## 1.6. Pruebas *in vitro*

### 1.6.1. Recogida de muestras

El personal de enfermería de los Servicios de Alergología de los distintos hospitales realizó la extracción de 10 ml de sangre periférica en tubos con gel (Vacuette, Greiner bio-one) y de 10-20 ml de sangre periférica en tubos con heparina lítica (Vacuette, Greiner bio-one). Los tubos con gel se emplearon para la obtención de suero por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, el suero obtenido se guardó a -20°C hasta su posterior uso. La sangre extraída en tubos con heparina lítica se usó en estudios celulares que se realizaron en un plazo máximo de 24 horas después de la extracción.

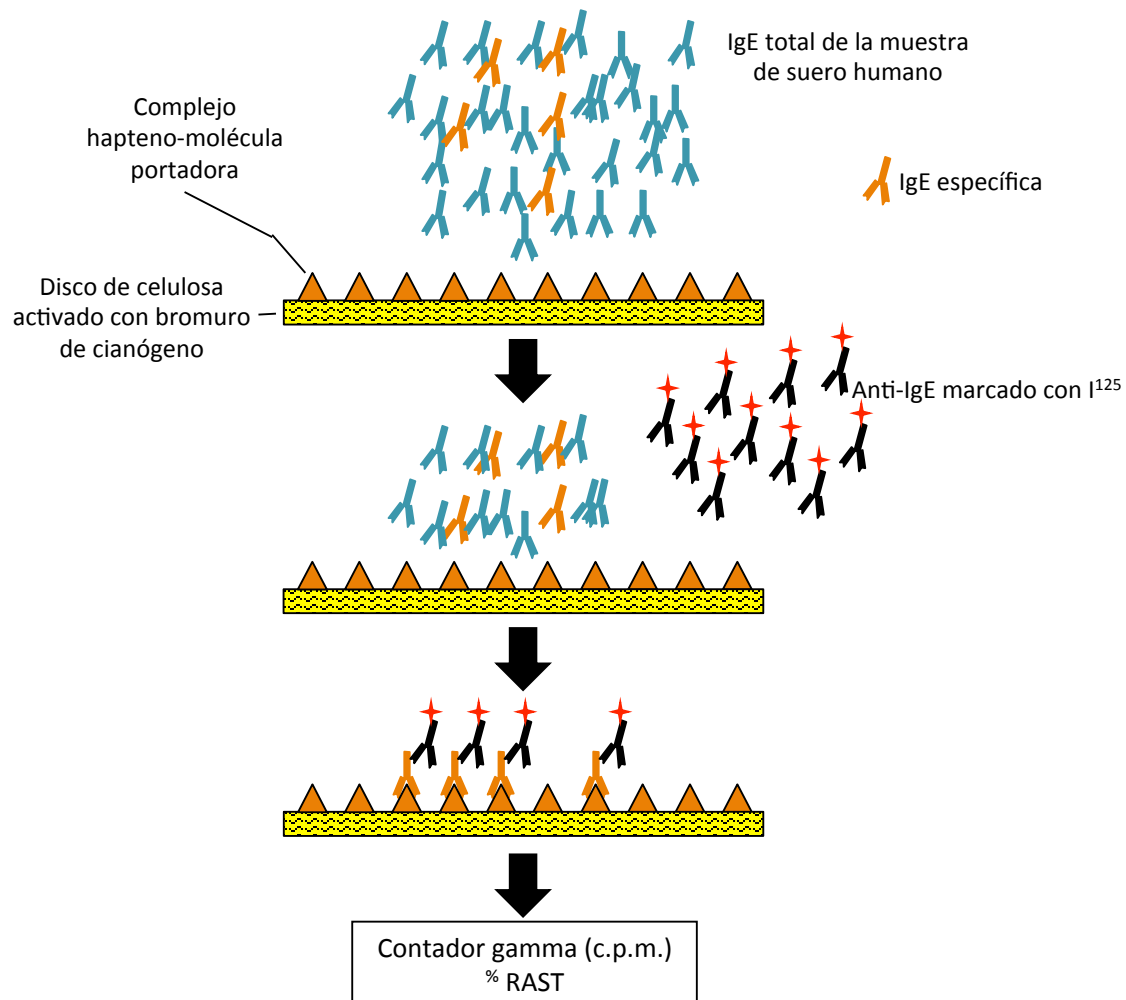
### 1.6.2. Radioinmunoensayo

Los niveles de IgE específica del suero de pacientes se determinaron mediante el radioinmunoensayo conocido como prueba radioalergoabsorbente (RAST) siguiendo el protocolo descrito por nuestro grupo de investigación (Moreno *et al.*, 1995). Se utilizó como fase sólida discos de celulosa (nº 54, Whatman International Ltd) activados con bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich) a los que se unió como molécula portadora PLL (Sigma-Aldrich) que se conjugó con BP (Normon) o AX (Glaxo Smithkline) como se ha descrito previamente (Edwards *et al.*, 1982; Blanca *et al.*, 1992). También se prepararon discos control a los que se unió PLL sin conjugar con ningún fármaco.

El ensayo se realizó siguiendo el método descrito por Wide *et al.* (Wide, 1969) incubando 30 µl de suero con discos de celulosa unidos a BPO-PLL, AXO-PLL y PLL durante 3 horas. Tras la incubación se hicieron 3 lavados con PBS-Tween20 0,05% (v/v) y después se añadieron 25 µL de un anticuerpo anti-IgE unido a I<sup>125</sup> (ALK-Abelló) con el que se incubaron las muestras durante 16 horas. Después de la incubación se hicieron 3 lavados con PBS-Tween20 0,05% (v/v) y se midió el número de cuentas por minuto en un contador gamma (Cobra II Auto Gamma Counting System, Perkin-Elmer Packard) (Figura 32).

Los resultados se expresaron como el número de cuentas por minuto obtenidas para los discos conjugados con BPO-PLL o AXO-PLL menos las cuentas obtenidas por minuto con los discos control de PLL, expresado como un porcentaje de cuentas por minuto con respecto a un valor máximo (Ecuación 1). Los resultados se consideraron positivos si el porcentaje era superior al 2,5%, lo que representa la

media + 2 DE del valor obtenido para los sueros del grupo control negativo del ensayo.



**Figura 32:** Esquema del procedimiento experimental del RAST.

$$\% RAST = \frac{cpm_{AXO-PLL} - cpm_{PLL}}{cpm_{Máximo}} \times 100$$

**Ecuación 1:** Cálculo del porcentaje del RAST.

$cpm_{AXO-PLL}$ : número de cuentas por minuto para AXO-PLL

$cpm_{PLL}$ : número de cuentas por minuto para PLL

$cpm_{Máximo}$ : número máximo de cuentas por minuto

### 1.6.3. Inhibición del RAST

Los ensayos de inhibición del RAST se realizaron siguiendo procedimientos previamente descritos (Batchelor *et al.*, 1966; Blanca *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1995). La inhibición del RAST sólo se realizó con sueros de pacientes con valores de porcentaje del RAST superiores al 7% y se usaron como inhibidores diferentes haptenos o haptenos conjugados a una molécula portadora preparados en PBS (Tabla 12, Figuras 34-35).

A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX	
Inhibidor	Concentración
AX (Diater)	0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM en PBS1x
Ácido amoxiciloico (Diater)	0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM en PBS1x
Dicetopiperacina (Diater)	0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM en PBS1x

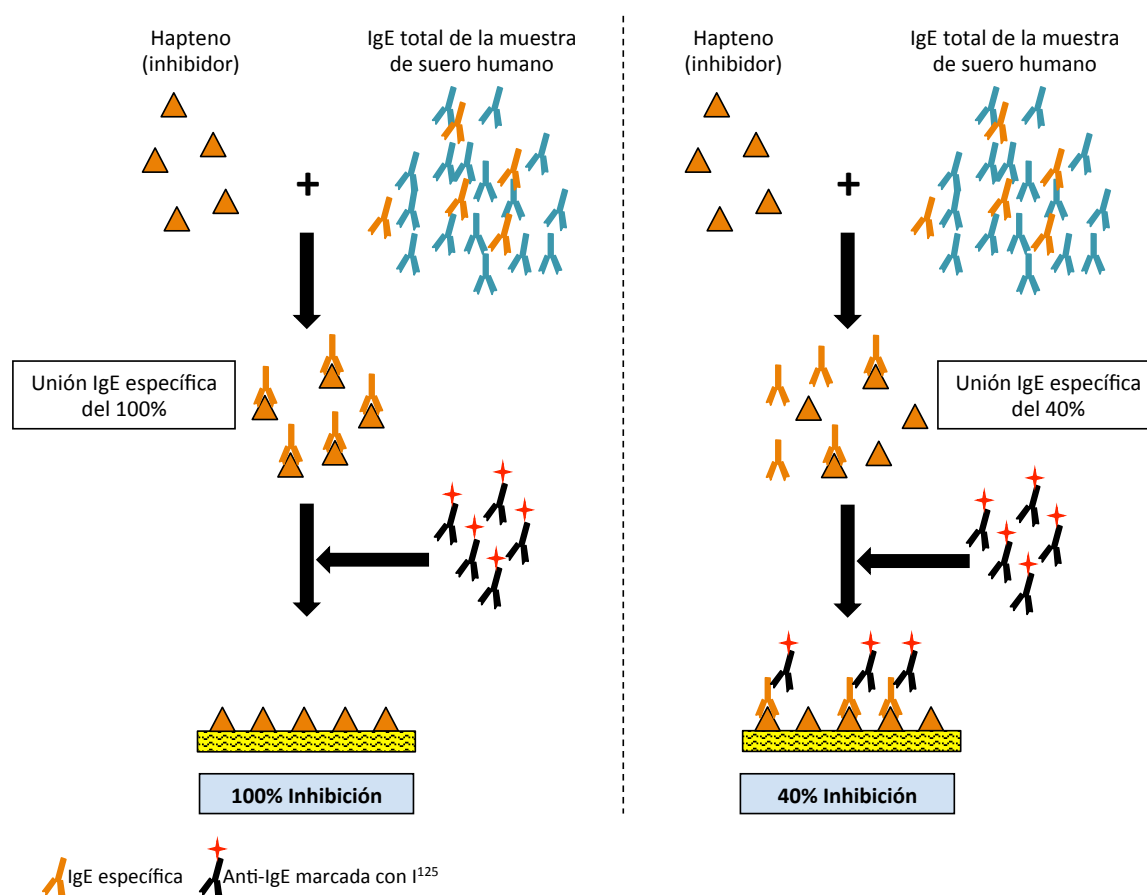
  

C. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX	
Inhibidor	Concentración
AX (Diater)	0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM en PBS1x *
Ácido amoxiciloico (Diater)	0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM en PBS1x *
AXO-BA	0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM en PBS1x *
AXO-HSA	0,1; 1; 5; 10; 30 mg/ml de HSA en PBS1x**
PAMAM-G4-(AXO) <sub>64</sub>	1; 10 y 100 mM en PBS1x *
PAMAM-G4-(AXO) <sub>32</sub> (BPO) <sub>32</sub>	1; 10 y 100 mM en PBS1x *

**Tabla 12:** Inhibidores y concentraciones empleadas en los ensayos de inhibición del RAST (\*concentración de AX; \*\*concentración de proteína).

El protocolo consistió en incubar 30 µl de suero con 15 µl de inhibidor durante 3 horas. Tras la incubación se añadió la fase sólida (disco de celulosa unido a AXO-PLL) a cada uno de los tubos del ensayo y se incubaron durante otras 3 horas tras las cuales se hicieron 3 lavados con PBS-Tween20 0,05% (v/v). A continuación se añadieron 25 µL del anticuerpo anti-IgE unido a I<sup>125</sup> (ALK Abelló), con el que se incubaron las muestras durante 16 horas. Después de la incubación se hicieron 3 lavados con PBS-Tween20 0,05% (v/v) y se midió el número de cuentas por minuto en un contador gamma (Figura 33).

Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de las cuentas por minuto obtenidas con los diferentes inhibidores con respecto a una muestra sin inhibir que se incubó con PBS en lugar de con el inhibidor (Ecuación 2). La comparación de la capacidad inhibitoria de las diferentes estructuras se realizó comparando la concentración de inhibidor necesaria para conseguir un 50% de inhibición de las cuentas por minuto obtenidas en la muestra sin inhibir.



**Figura 33:** Esquema del procedimiento experimental de la inhibición del RAST.

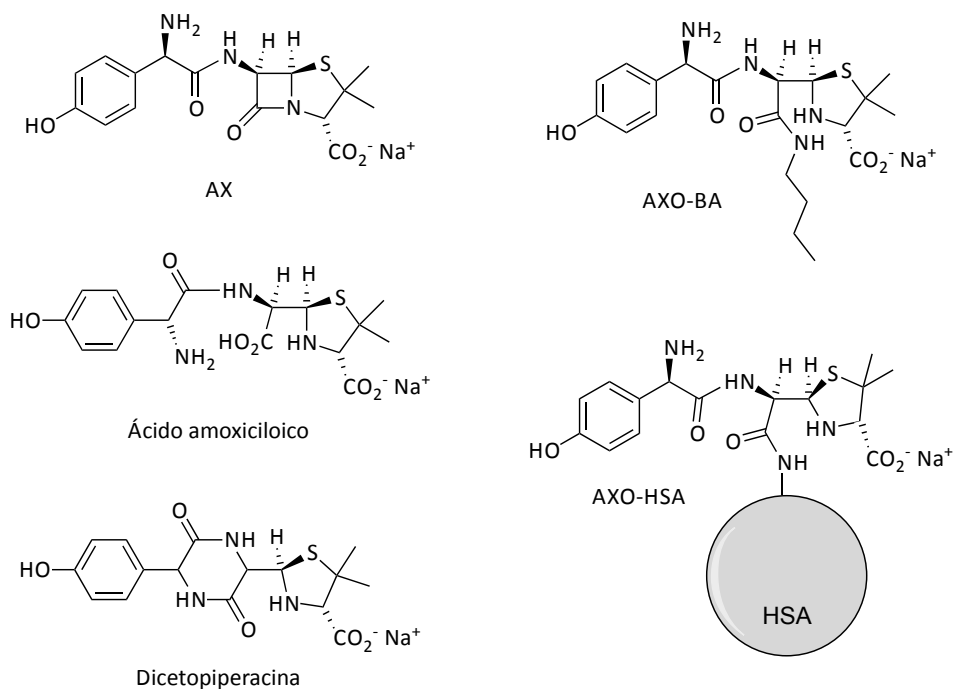
$$\%Inhibición = \frac{\%RAST_a - \%RAST_b}{\%RAST_a} \times 100$$

**Ecuación 2:** Cálculo del porcentaje de inhibición del RAST.

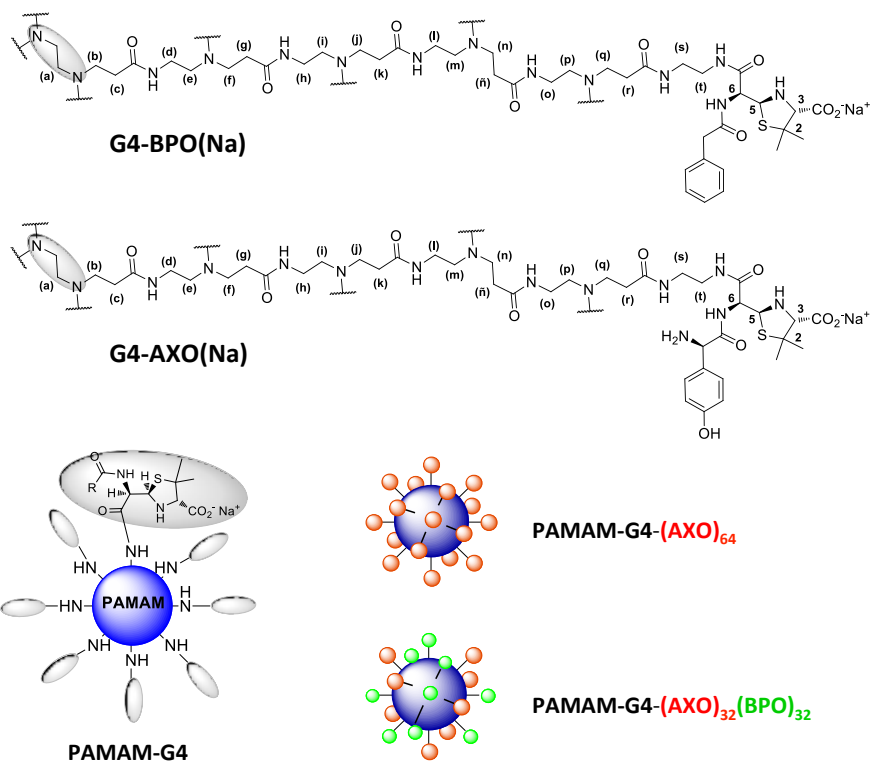
%RAST<sub>a</sub>: % RAST sin inhibidor

%RAST<sub>b</sub>: % RAST con inhibidor





**Figura 34:** Estructura química de la AX, ácido amoxiciloico, dicotopiperacina, AXO-BA y AXO-HSA empleados como inhibidores.



**Figura 35:** Estructura de los conjugados dendriméricos PAMAM-G4-(AXO)<sub>64</sub> y PAMAM-G4-(AXO)<sub>32</sub>(BPO)<sub>32</sub> empleados como inhibidores.

#### 1.6.4. Test de activación de basófilos

El test de activación de basófilos (TAB) se realizó siguiendo protocolos ya descritos introduciendo algunas modificaciones (Torres *et al.*, 2004). Se realizó con muestras de sangre completa de pacientes y controles, y la concentración final de los diferentes haptenos se seleccionó a partir de curvas dosis-respuesta y estudios de citotoxicidad (Tabla 13).

A. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX	
Hapteno	Concentración
AX (Diater)	0,025 y 1,25 mg/ml
Ácido amoxiciloico (Diater)	0,025 y 1,25 mg/ml
Dicetopiperacina (Diater)	0,025 y 1,25 mg/ml

B. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV	
Hapteno	Concentración
BP (Penibiot® vía intravenosa-intramuscular, Normon)	0,2; 0,4; 2 y 4 mg/ml
AX (Clamoxyl® intramuscular, Glaxo Smithkline)	0,05; 0,25; 1,25 y 2,5 mg/ml
AX-CLV (Combino-Pharm)	0,05/0,01; 0,25/0,05; 1,25/0,25 y 2,5/0,5 mg/ml
CLV (Vetranal™, Fluka, Sigma-Aldrich)	0,05; 0,25; 1,25 y 2,5 mg/ml

**Tabla 13:** Haptenos y concentraciones empleadas en el TAB.

El procedimiento experimental a seguir fue el siguiente (Figura 36):

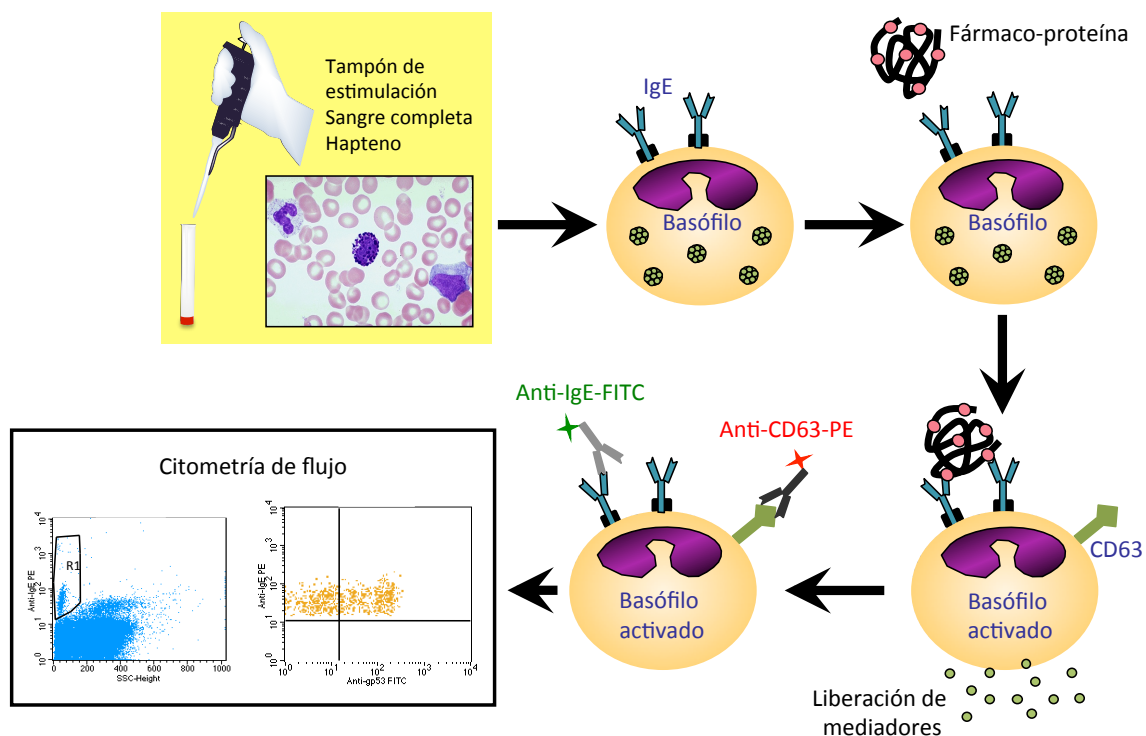
- Degranulación: Se añadieron 20 µl de tampón de estimulación y 100 µl de sangre periférica por tubo del ensayo, y se incubaron a 37°C durante 10 minutos en agitación. A continuación se añadieron 100 µl del hapteno disuelto en PBS-Tween20 0,05% (v/v), 100 µl de PBS-Tween20 0,05% (v/v) como control negativo y 100 µl de péptido quimiotáctico fMLP (Orpegen Pharma) y anti-IgE humana (BD Biosciences) como controles positivos. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación. Se detuvo la degranulación de las células incubando las muestras en hielo durante 5 minutos.
- Marcaje: Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados a una partícula fluorescente, para ello se añadieron 3 µl de anti-IgE-FITC (Invitrogen) y

1,5  $\mu$ l de anti-CD63-PE (Invitrogen) con los que se incubaron las muestras durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

- **Lisis:** Se lisaron los glóbulos rojos y se fijaron el resto de células sanguíneas con 2 ml de solución de lisis (BD FACS Lysing solution, BD Biosciences), incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 1200 rpm y se eliminaron los sobrenadantes por decantación.

- **Lavado:** Las muestras se lavaron con PBS-Tween20 0,05% (v/v), se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y se eliminaron los sobrenadantes por decantación.

Las determinaciones celulares se realizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), adquiriendo un mínimo de 1000 basófilos por muestra y los resultados se analizaron mediante el programa CellQuest (BD Biosciences). Los resultados de activación celular se consideraron positivos cuando el índice de estimulación (IE), calculado como el cociente entre el porcentaje de basófilos activados con los diferentes haptenos y el control negativo, era  $\geq 2$  para al menos una de las concentraciones del hapteno.



**Figura 36:** Esquema del procedimiento experimental del TAB.

### **1.6.5. Inhibición del test de activación de basófilos con wortmanina**

La inhibición del TAB con wortmanina (WTM) (Sigma-Aldrich) se realizó como se ha descrito previamente en otros trabajos (Knol *et al.*, 1990; Knol *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2003). El protocolo a seguir fue el descrito previamente para el TAB, pero tras la incubación de 10 minutos de la muestra de sangre periférica con el tampón de estimulación se añadieron 1,2; 2,5 ó 13  $\mu$ l de WTM 50  $\mu$ M (concentración final de 0,5; 1 y 5  $\mu$ M respectivamente) con los que se incubaron las muestras durante 5 minutos a 37°C en agitación. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l del fármaco, del tampón de lavado como control negativo o de los controles positivos fMLP y anti-IgE y se continuó el protocolo descrito en el apartado anterior.

### **1.7. Estudios estadísticos**

Los resultados de las variables continuas se expresaron como el valor de la media  $\pm$  el error estándar estadístico. Los estudios comparativos entre variables cuantitativas que no seguían una distribución normal se realizaron empleando métodos no paramétricos para dos variables (prueba de Mann-Whitney) o para más de dos variables independientes (prueba de Kruskal Wallis). En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS versión 15.0.

## **2. Identificación de proteínas séricas y celulares modificadas por AX y caracterización de aductos HSA-AX generados *in vitro***

Los siguientes trabajos experimentales se realizaron en el Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C (Madrid), en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas “Pietro Pratesi” de la “Università degli Studi di Milano” (Milán, Italia) y en Laboratorio de Investigación del Hospital Carlos Haya – I.B.I.M.A. (Málaga).

### **2.1. Extracción de HSA desde suero humano mediante cromatografía de afinidad**

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica de donantes sanos en tubos con gel para la obtención de suero por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos. El suero se alicuotó y se guardó a -80°C para su uso posterior.

La extracción de HSA se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando agarosa unida covalentemente al colorante Cibacron®Blue F3GA (Affi-Gel®Blue Gel, Bio-Rad) que tiene una capacidad de unión a la albúmina de más de 11 mg/ml.

#### **2.1.1. Preparación Affi-Gel®Blue Gel**

Se añadieron 500 µl de Affi-Gel®Blue Gel (Bio-Rad) a cada una de las columnas necesarias para el aislamiento de HSA (columnas Prep Spin column kit, Sigma-Aldrich) que se centrifugaron a 500 rpm durante 1 minuto. Para acondicionar las columnas se hicieron 5 lavados con tampón A (PBS 20 mM, pH 7,1) centrifugando a 500 rpm durante 1 minuto.

#### **2.1.2. Extracción de HSA a partir de suero humano**

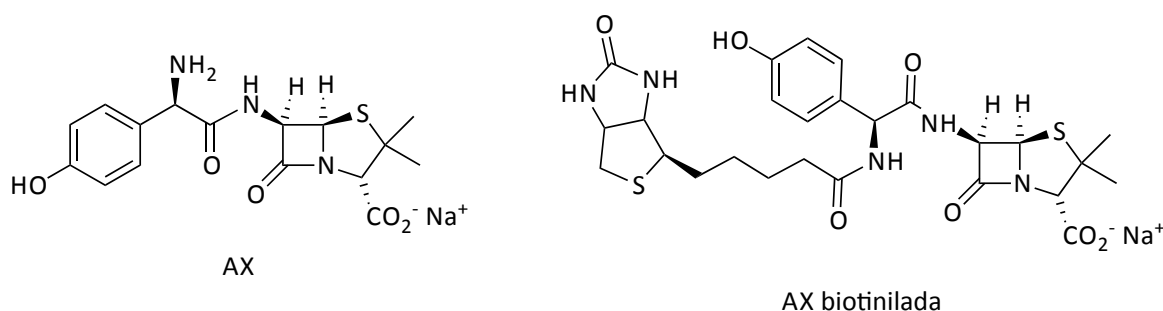
Se diluyeron 50 µl de suero con 150 µl de tampón A (PBS 20 mM, pH 7,1) y se dejaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Se cargó la muestra sobre la columna de gel y se centrifugó a 500 rpm durante 1 minuto (la HSA quedó atrapada en el gel). Se recuperó el eluido de la muestra y se cargó de nuevo en la columna con el fin de maximizar la recuperación de HSA a partir de suero y se centrifugó durante 1 minuto a 500 rpm (este paso se repitió 3 veces). Se hicieron 2 lavados con el tampón A centrifugando a 500 rpm durante 1 minuto. Para eluir la muestra se añadieron 250 µl del tampón B (tampón A + NaCl 1,4 M) y se centrifugó a 500 rpm durante 1 minuto. La concentración de HSA extraída se determinó midiendo la absorbancia a 279 nm.

Las muestras de HSA se concentraron en columnas de filtración YM-30 con un tamaño de poro de 30 kDa (Microcon Centrifugal Filter Devices, Millipore). En primer lugar se acondicionaron los filtros con H<sub>2</sub>O milliQ centrifugando 6 minutos a 12500 rpm. Se cargaron las muestras en los filtros y se centrifugaron a 12500 rpm durante 6 minutos. Los lavados posteriores se hicieron con 500 µl de H<sub>2</sub>O milliQ y centrifugando a 12500 rpm hasta que en los filtros quedó un volumen de muestra de 50 µl. Para la recuperación de las muestras concentradas se invirtieron los filtros en tubos colectores nuevos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. Las muestras se secaron por centrifugación en vacío y se guardaron a -20°C hasta su uso posterior.

## 2.2. Modificación *in vitro* de proteínas séricas humanas por AX

### 2.2.1. Modificación *in vitro* de HSA por AX y AX biotinilada

Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de AX (Clamoxyl® Glaxo Smithkline) y AX biotinilada (sintetizada por el grupo del Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga) en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) o en PBS (pH 7,4). Se incubó durante 16 horas a 37°C cada una de las soluciones de AX o AX biotinilada con un volumen equivalente de HSA (Sigma-Aldrich) preparada en bicarbonato sódico 0,1 M o en PBS (pH 7,4). La concentración final de HSA en la incubación fue de 10 mg/ml (0,15 mM) y en el caso de la AX y la AX biotinilada se emplearon unas concentraciones finales comprendidas entre  $1,6 \times 10^{-4}$  y 10 mg/ml. Los aductos resultantes se separaron por SDS-PAGE seguida de la detección de la modificación mediante Western blot y/o espectrometría de masas.



**Figura 37:** Estructura química de la AX y de la AX biotinilada.

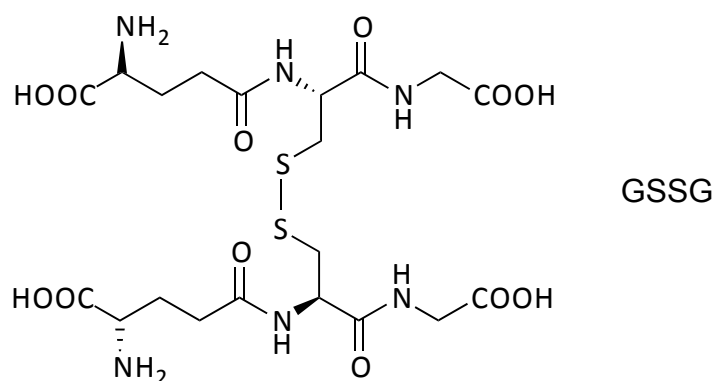
### 2.2.2. Modificación *in vitro* de suero humano por AX

Se prepararon soluciones a concentraciones crecientes de AX (Clamoxyl® Glaxo Smithkline) en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) o en PBS (pH 7,4) y se incubaron con un volumen equivalente de suero humano (Sigma-Aldrich) durante 16 horas a 37°C. Los aductos resultantes se analizaron por electroforesis monodimensional y bidimensional seguidas de la detección de la modificación por Western blot y la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas.

### 2.2.3. Modificación *in vitro* de HSA y suero humano por AX en presencia de glutatión oxidado

Una solución de HSA (Sigma-Aldrich) preparada en PBS o una alícuota de suero humano (Sigma-Aldrich) se incubó durante 6 horas a 37°C con glutatión oxidado (GSSG) (Sigma-Aldrich) preparado en PBS, siendo la concentración final del

agente oxidante de 5 mM. Tras esta incubación previa, la muestra de HSA o de suero humano se incubó durante 16 horas a 37°C con un volumen equivalente de una solución de AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2). La concentración final de HSA y AX en la incubación fue de 10 mg/ml (0,15 mM) y 0,5 mg/ml (1,37 mM) respectivamente. Los aductos resultantes se analizaron por SDS-PAGE seguida de la detección de la modificación mediante Western blot.



**Figura 38:** Estructura química del glutatión oxidado (GSSG).

## 2.3. Modificación de proteínas celulares por AX

### 2.3.1. Cultivos celulares

Una línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) (ATCC) se cultivó en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen) al 10% (v/v), penicilina 100 U/ml (Invitrogen) y estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen) evitando llegar a la confluencia celular. Los pases de estas células adherentes se realizaron mediante tripsinización, lavado con medio completo, centrifugación durante 5 minutos a 1000 rpm y resuspensión en medio fresco. Las células se mantuvieron en cultivo en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C.

### 2.3.2. Tratamientos con AX y AX biotinilada

Los tratamientos se realizaron en medio de cultivo DMEM sin FBS y sin antibióticos (se retiraron 24 horas antes de comenzar con el tratamiento). La AX (Clamoxyl® Glaxo Smithkline) y AX biotinilada (sintetizada por el grupo del Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa) se disolvieron en PBS y se añadieron en los cultivos a varias concentraciones (0,5-2,5 mg/ml) y en los cultivos control se añadió un volumen equivalente de PBS. Los tratamientos se realizaron cuando las células se encontraban a un 80-90% de confluencia para la obtención de lisados celulares y a

un 70-80% de confluencia para la visualización por microscopía de fluorescencia. La duración de los tratamientos fue de 24 horas.

### **2.3.3. Obtención de lisados celulares**

Para analizar las proteínas celulares modificadas tras el tratamiento con AX y AX biotinilada se procedió a retirar el medio de las placas de cultivo y a realizar varios lavados con PBS antes de añadir sobre las células un tampón de lisis que contenía Tris-EDTA-EGTA, detergente e inhibidores de proteasas y fosfatasas. La homogeneización se llevó a cabo mediante pases forzados a través de agujas de 26G½ (BD Biosciences) y a continuación las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante libre de restos celulares. Finalmente se cuantificó la concentración de proteínas del lisado celular mediante ensayo de BCA (Pierce) midiendo la absorbancia a 540 nm. Los aductos resultantes fármaco-proteína se analizaron mediante electroforesis monodimensional y bidimensional seguidas de la detección de la modificación por Western blot y la identificación de proteínas modificadas por espectrometría de masas.

## **2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot**

### **2.4.1. Electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida**

Las muestras de proteínas séricas y celulares modificadas por AX o AX biotinilada (y controles sin modificar) se desnaturalizaron en tampón de Laemmli incubándolas durante 5 minutos a 96°C. A continuación se cargaron cantidades variables de proteína (1-15 µg) en geles de SDS-poliacrilamida (SDS Bio-Rad; acrilamida 30%/bis-acrilamida Bio-Rad) junto con un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards Dual color, Bio-Rad) y el sistema de electroforesis se conectó a una fuente de alimentación a un voltaje constante de 100-120 V.

### **2.4.2. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida**

A partir de alícuotas de muestras séricas o celulares modificadas por AX o AX biotinilada (y controles sin modificar) se precipitaron 100-150 µg de proteína en ácido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v) incubando las muestras 10 minutos en hielo. Posteriormente el precipitado se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 8°C y el “pellet” obtenido se lavó 1 vez con etanol al 80% (v/v) y 2 veces con acetona pura.



El precipitado se dejó secar durante toda la noche y a continuación se resuspendió en 280 µl de tampón de rehidratación para el isoelectroenfoque.

Las muestras resuspendidas se dividieron en 2 alícuotas y se cargaron en tiras de isoelectroenfoque (pH 3-10 lineal, 7 cm. Ready Strip IPG Strip, Bio-Rad) mediante rehidratación activa durante 16 horas a 50 V y 18°C seguida del isoelectroenfoque realizado en unas condiciones de aumento lineal del voltaje en 4 etapas a 18°C (S1: 250 V 15 min; S2: 4000 V/h 2 h; S3: 4000-20000 V/h; S4: 500 V), todo ello realizado con una fuente de isoelectroenfoque "Protean IEF Cell" (Bio-Rad). A continuación las tiras se equilibraron en un tampón con urea 6 M, SDS 2 % (p/v), Tris 0,375 M (pH 8,8) y glicerol 20 % en 2 pasos de 10 minutos cada uno. En el primer equilibrado el tampón contenía DTT 130 mM (Invitrogen) y en el segundo equilibrado iodoacetamida 135 mM (Sigma-Aldrich).

Finalmente para realizar la segunda dimensión (SDS-PAGE), las tiras de isoelectroenfoque se cargaron por duplicado en geles de SDS-poliacrilamida (12,5%) empleando agarosa al 0,5% (p/v) para fijar las tiras de isoelectroenfoque a los geles de poliacrilamida. Cuando finalizó la electroforesis, uno de los geles se tiñó con Coomassie coloidal (Simply Blue Safe Stain, Invitrogen) o con SYPRO Ruby (Sigma-Aldrich) para obtener el patrón de proteínas totales y el otro gel se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) para detectar las proteínas modificadas por fármacos mediante Western blot.

### **2.4.3. Western blot**

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) mediante un sistema de transferencia semiseco (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las membranas correspondientes a las muestras de proteínas modificadas por AX se incubaron con anticuerpos primarios monoclonales anti-AX desarrollados por nuestro grupo de investigación por la Dra. Cristobalina Mayorga (Mayorga *et al.*, 1995) (AO3.2, AO14.1, AO18.2, AO19.1, AO24.1) o con un anticuerpo primario monoclonal anti-penicilina (Serotec AbD), todos ellos desarrollados en ratón. Como anticuerpo secundario se empleó anti-Ig de ratón conjugada con peroxidasa (Dako Cytomation). Los diferentes anticuerpos se diluyeron en una solución de BSA al 1% (p/v) en TBS-Tween20 0,05% (v/v). Las membranas correspondientes a las muestras de proteínas modificadas por AX biotinilada se incubaron con estreptavidina

conjugada con peroxidasa (Amersham, GE Biosciences) preparada en una solución de BSA al 1% (p/v) en TBS-Tween20 0,05% (v/v). Los inmunocomplejos y los complejos biotina-estreptavidina se detectaron por quimioluminiscencia empleando para su revelado películas de autorradiografía (CURIX, Agfa) o un sistema analizador de imágenes (ImageQuant LAS4000, GE Healthcare).

Posteriormente las membranas transferidas se tiñeron con Coomassie coloidal como control de la cantidad de proteína transferida.

#### **2.4.4. Medida de la intensidad de las señales inmunorreactivas obtenidas mediante Western blot**

Se comparó el grado de intensidad de las señales inmunorreactivas obtenidas mediante Western blot para las distintas proteínas y condiciones de los ensayos analizando las imágenes de las películas de autorradiografía escaneadas con el programa informático “Scion Image” de Scion Corporation.

### **2.5. Espectrometría de masas**

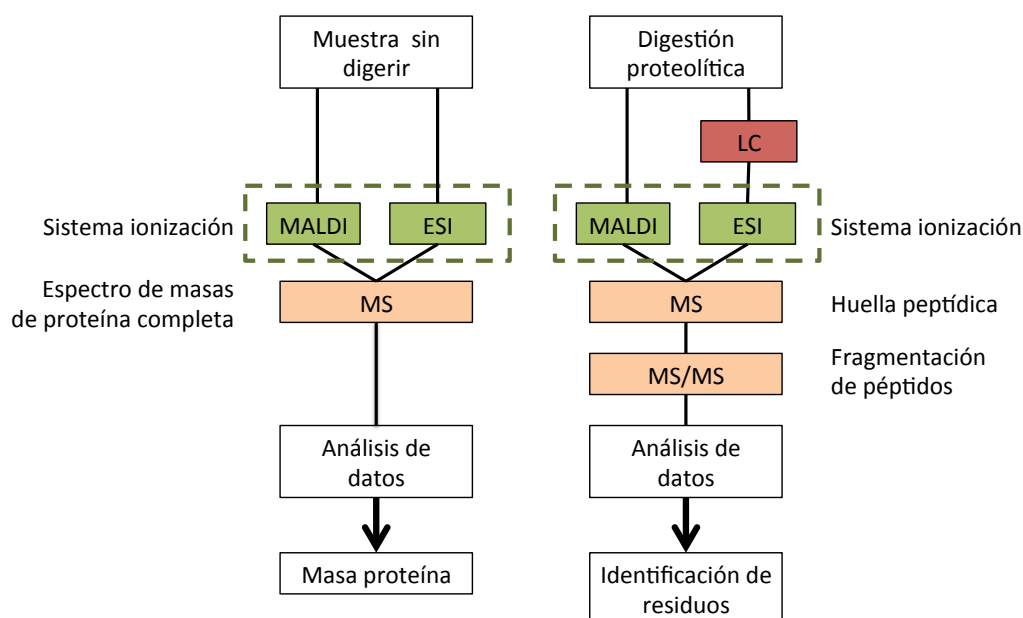
Los ensayos de espectrometría de masas se realizaron en los Servicios de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas y del Centro Nacional de Biotecnología, ambos pertenecientes al C.S.I.C. y ubicados en Madrid, y en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas “Pietro Pratesi” de la “Università degli Studi di Milano” (Italia). En cada uno de estos centros se empleó un espectrómetro de masas de diferentes características (Tabla 14).

Centro	Espectrómetro de masas
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Servicio de Proteómica Madrid, España	MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics)
Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Servicio de Proteómica Madrid, España	4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems)
Departamento de Ciencias Farmacéuticas “Pietro Pratesi” de la “Università degli Studi di Milano”, Italia	Trampa iónica lineal LTQ Orbitrap™ XL (Thermo Scientific)

**Tabla 14:** Centros de investigación en los que se han realizado los ensayos de espectrometría de masas y tipo de espectrómetro de masas empleado.

Se realizaron los siguientes ensayos de espectrometría de masas (Figura 39):

- Análisis de proteína completa por espectrometría de masas con sistema de ionización por desorción mediante láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS).
- Análisis de proteína completa por espectrometría de masas con sistema de ionización por electrospray (ESI-MS).
- Identificación de residuos de proteína modificados mediante espectrometría de masas en tándem con sistema de ionización por desorción mediante láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-TOF MS/MS).
- Identificación de residuos de proteína modificados mediante separación de péptidos tripticos por cromatografía líquida y análisis por espectrometría de masas en tándem con sistema de ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS).



**Figura 39:** Ensayos de espectrometría de masas.

### 2.5.2. Digestión de HSA modificada *in vitro* por AX

a) Digestión de HSA modificada *in vitro* por AX para ensayos de huella peptídica y de MS/MS mediante MALDI-TOF-TOF

a1) Digestión en solución

Las muestras de HSA modificadas *in vitro* por AX y un control sin modificar se diluyeron hasta una concentración de 1 mg/ml en un volumen final de 10 µl con trifluoroetanol (TFE) al 50% preparado en bicarbonato amónico 50 mM. Se añadieron 0,2 µl de DTT 500 mM (concentración final 10 mM) y se realizó una

incubación de 15 minutos a 55°C. A continuación se incubaron con 1 µl de iodoacetamida 500 mM (concentración final 50 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se diluyeron 10 veces en bicarbonato amónico 25 mM y se añadió tripsina en una proporción enzima:proteína comprendida entre 1:10 – 1:50. La mezcla de digestión se dejó incubando durante 8-16 horas a 37°C.

En la tabla 15 se recogen diferentes variaciones realizadas sobre el protocolo general relacionadas con el tratamiento previo de la proteína con TFE, DTT e iodoacetamida, la proporción enzima:proteína y el tiempo de incubación de la mezcla de digestión.

Tratamiento previo HSA	Secado muestra previo a la tripsinización	Preparación tripsina y casa comercial	Tripsina:HSA	Tripsinización
NO	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:25	o/n a 37°C
NO	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:50	o/n a 37°C
TFE (50%)	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:10	o/n a 37°C
TFE (50%) (añadir sobre muestra proteína seca)	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:10	o/n a 37°C
DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:20	o/n a 37°C
DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	NO	En HCl 1 mM (Promega)	1:20	o/n a 37°C
TFE (50%), DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	NO	En HCl 1 mM (Promega)	1:10	o/n a 37°C
DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	SI	En bicarbonato amónico 25 mM (Promega)	1:20	o/n a 37°C

**Tabla 15:** Variaciones entre los diferentes protocolos de digestión de proteína en solución.

#### a2) Digestión en gel

- Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas: Las digestiones se realizaron a partir de muestras de proteínas separadas por electroforesis monodimensional o bidimensional. Los geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie coloidal o con tinción fluorescente con SYPRO Ruby se introdujeron en un sistema EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) para la detección y escisión automática de los “spots” de interés. Los “spots” escindidos se depositaron en placas de 96

pocillos y se realizó la digestión automática de los mismos usando un digestor DigestPro MS (Intavis AG). El protocolo de digestión usado estaba basado en el descrito por Schevchenko *et al.* (Schevchenko *et al.*, 2006) con algunas variaciones. Las piezas de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM (Sigma-Aldrich), a continuación con acetonitrilo (Sharlau) y finalmente se incubaron durante 8 horas a 37°C con tripsina (Promega) preparada a una concentración final de 12,5 ng/μl en bicarbonato amónico 50 mM. La extracción de los péptidos se realizó añadiendo acetonitrilo al 70% con TFA al 0,5% (Sigma-Aldrich). Los péptidos tripsinizados eluidos se secaron en una centrífuga de vacío y se resuspendieron en 4 μl de acetonitrilo al 30% con TFA al 0,1%.

- Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología: Las digestiones se realizaron a partir de muestras de proteínas separadas por electroforesis monodimensional y las bandas de proteína de los geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie coloidal se recortaron manualmente del gel y se procesaron de forma automática en una estación de digestión y preparación Proteineer DP (Bruker Daltonics). El protocolo de digestión empleado fue el descrito por Schevchenko *et al.* (Schevchenko *et al.*, 2006) con ligeras variaciones. Las bandas se lavaron con 25 μl de bicarbonato amónico 50 mM y con 25 μl de acetonitrilo. A continuación se procedió a la reducción con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM durante 20 minutos a 56°C y a la alquilación con iodoacetamida a 50 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las bandas se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y se secaron a 40°C. A las bandas de gel secas se les añadió tripsina (Promega) a una concentración final de 15 ng/μl en bicarbonato amónico 25 mM con acetonitrilo al 50%. Se dejó una primera etapa de digestión de 45 minutos a 4°C y a continuación se añadió bicarbonato amónico 50 mM para proseguir la segunda etapa de digestión durante 4 horas más a 37°C. Los péptidos tripticos se extrajeron con TFA al 0,5% durante 15 minutos. Las muestras se secaron en una centrífuga de vacío y se reconstituyeron en acetonitrilo acuoso al 30%/15% isopropanol y TFA al 0,1% sonicando la muestras durante 3 minutos.

b) Digestión de HSA modificada *in vitro* por AX para su análisis por LC-ESI-MS y LC-ESI-MS/MS

La muestra de partida debía contener alrededor de 20 μg de proteína en un volumen de 25-100 μl. En nuestro ensayo empleamos muestras que contenían 30 μg

de proteína, que se habían secado previamente en una centrífuga de vacío y reconstituido en 30 µl de bicarbonato amónico 50 mM (pH 7,8).

Se añadieron 2 µl de DTT 20 mM (concentración final 1 mM) a las muestras reconstituidas y se incubaron durante 45-60 minutos a 60°C. A continuación se incubaron con 8 µl de iodoacetamida 20 mM (concentración final 4 mM) durante 45-60 minutos a 37°C en oscuridad. Finalmente se añadieron 8 µl de DTT 20 mM (concentración final 4 mM), incubando las muestras 45-60 minutos a 37°C. Para la digestión con tripsina (Promega) se añadieron 10 µl de CaCl<sub>2</sub> 5 mM (concentración final 1 mM) y con quimotripsina (Roche) 10 µl de CaCl<sub>2</sub> 50 mM (concentración final 10 mM). La tripsina se preparó a una concentración de 0,1 µg/µl en tampón acetato y la quimotripsina a 0,1 µg/µl en HCl 1 mM. Las enzimas se añadieron en una proporción enzima:proteína de 1:20 y la mezcla de digestión se dejó incubando durante 16 horas a 37°C.

### **2.5.3. Análisis por espectrometría de masas de HSA modificada *in vitro* por AX**

#### **a) Análisis de muestras de HSA modificada *in vitro* por AX mediante MALDI-TOF MS**

Estos experimentos se realizaron en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas en un espectrómetro de masas Autoflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics).

Se emplearon muestras de HSA modificada por AX y muestras control sin modificar que se purificaron en mini-columnas de fase reversa (ZipTip C4, Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante y se reconstituyeron en H<sub>2</sub>O milliQ. La solución matriz compuesta por 2,5-dihidroxi-acetofenona (2,5-DHAP) se preparó disolviendo 7,6 mg (50 µmoles) en 375 µl de etanol y 125 µl de di-amonio hidrógeno citrato a 80 mM en solución acuosa. Se disolvieron 2 µl de cada muestra proteica en 2 µl de TFA al 2% y 2 µl de la solución matriz. Se depositó 1 µl de esta mezcla sobre una placa MALDI AnchorChip de 800 mm (Bruker Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espectros se adquirieron usando una potencia de láser justo por encima del umbral de ionización, detectando los iones positivos. La calibración externa se realizó usando albúmina bovina (Sigma-Aldrich), abarcando un intervalo de peso molecular comprendido entre los 20000 y los 70000 Da.

**b) Análisis de muestras de HSA modificada *in vitro* por AX mediante ESI-MS**

El trabajo experimental de este apartado se realizó por el grupo de investigación del profesor Giancarlo Aldini del Departamento de Ciencias Farmacéuticas “Pietro Pratesi” de la “Università degli Studi di Milano” (Italia), donde se realizó el análisis de las muestras en un espectrómetro de masas con trampa iónica lineal LTQ Orbitrap™ XL (Thermo Scientific) equipado con una fuente de ionización por electrospray (Finnigan Ion Max).

Se tomaron 3 alícuotas de las diferentes muestras de HSA modificada por AX y se filtraron y desalaron por separado en columnas de filtración YM-30 con un tamaño de poro de 30 kDa (Microcon Centrifugal Filter Devices, Millipore) según se describe a continuación. En primer lugar se acondicionaron los filtros con H<sub>2</sub>O milliQ centrifugando durante 6 minutos a 12500 rpm. Se cargaron las muestras en las columnas y se centrifugaron a 12500 rpm durante 6 minutos. Después se realizaron diferentes lavados en cada una de las alícuotas para eliminar de forma progresiva las posibles interacciones no covalentes entre la proteína y el fármaco: la primera alícuota se lavó 4 veces con 0,3 ml de H<sub>2</sub>O milliQ, la segunda alícuota se lavó 2 veces con 0,3 ml de H<sub>2</sub>O milliQ y 2 veces con 0,3 ml de etanol en solución acuosa en una proporción H<sub>2</sub>O:EtOH 1:1 (v:v), y la tercera alícuota se lavó 4 veces con 0,3 ml de etanol en solución acuosa en una proporción H<sub>2</sub>O:EtOH 1:1 (v:v). Tras cada lavado las muestras se centrifugaron a 12500 rpm hasta que finalmente quedó un volumen de muestra de 50 µl. Para la recuperación de las muestras concentradas se invirtieron las columnas de filtración en un nuevo tubo colector y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. Las alícuotas concentradas (96 µg de proteína) se diluyeron en 200 µl de H<sub>2</sub>O y 200 µl de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/HCOOH (60:40:0,4 v/v/v) y se inyectaron en el espectrómetro de masas con una velocidad de flujo de 5 µl/min. Como calibración interna se usó una lista de 20 contaminantes plásticos comunes que se detectan como señal de fondo en el análisis por ESI-MS.

**2.5.4. Identificación de residuos de la HSA modificados *in vitro* por AX****a) Identificación de los residuos de la HSA modificados *in vitro* por AX mediante MALDI-TOF-TOF MS/MS****a1) Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas**

Se emplearon muestras de HSA modificada *in vitro* por AX y controles de HSA sin modificar digeridos en solución con tripsina. 1 µl cada muestra tripsinizada se

depositó sobre una placa AnchorChip de 800  $\mu\text{m}$  (Bruker Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. 1  $\mu\text{l}$  de la solución matriz (3 mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) preparada en acetonitrilo al 33% con TFA al 0,1% se depositó sobre el producto de la digestión y se dejó secar a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics) y se tomaron 1000 scans para el análisis de huella peptídica y 2000 scans para el de MS/MS. La calibración interna del análisis de MALDI-TOF MS se realizó usando 2 iones de autólisis de la tripsina con un valor de  $m/z$  de 842,510 y 2211,05 Da y las calibraciones para el análisis de MALDI-TOF/TOF MS/MS se realizaron con fragmentos de iones obtenidos a partir de aductos protonados de una mezcla de péptidos que abarca un intervalo de valores  $m/z$  de 800-3200 Da. El error típico observado en la precisión de los valores de masa en la calibración era normalmente inferior a 20 ppm.

Los datos obtenidos por MALDI-MS y MS/MS se enviaron a través del programa BioTools 3.0 (Bruker Daltonics) al programa Mascot (Matrix Science) para efectuar la búsqueda en la base de datos pública de proteínas del NCBI (NCBI: 20100306). Los parámetros de búsqueda establecidos fueron los siguientes: enzima, tripsina; modificaciones, carbamidometil (C), oxidación (M); se permitió la pérdida de un corte triptico; tolerancia peptídica, 50 ppm; tolerancia MS/MS, 0,5 Da. Se consideraron significativas ( $p < 0,05$ ) puntuaciones de probabilidad superiores a 75.

#### a2) Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología

Se emplearon muestras de HSA modificada *in vitro* por AX y controles de HSA sin modificar digeridos en solución con tripsina. Se depositó una alícuota de 0,8  $\mu\text{l}$  de la mezcla de péptidos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0,8  $\mu\text{l}$  de solución matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico 3 mg/ml en acetonitrilo acuoso al 30%/15% isopropanol y TFA al 0,1%) en una placa OptiTOF (Applied Biosystems) y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron de manera automática en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector positivo de iones (con un voltaje de aceleración de iones de 25 kV para la adquisición de los espectros de MS y de 1 kV para los de MS/MS). Cada espectro de huella peptídica fue calibrado internamente empleando determinadas señales provenientes de la autólisis de la tripsina. El error típico observado en la precisión de los valores de masa en la calibración era inferior a 30 ppm.



Los datos de masa correspondientes a los péptidos trípticos obtenidos se enviaron automáticamente a través del programa Global Protein Server (GPS, Applied Biosystems) al programa Mascot (Matrix Science) para efectuar la búsqueda en la base de datos pública NCBI nr. Los parámetros de búsqueda establecidos fueron: enzima, tripsina; se permitió la pérdida de un corte tríptico; tolerancia peptídica, 100 ppm. En todos los casos en que se validó la identificación de una proteína, la puntuación de probabilidad superó el umbral establecido por el motor de búsqueda Mascot ( $p < \text{al valor fijado como significativo}$ ).

b) Identificación de los residuos de HSA modificados *in vitro* por AX mediante LC-ESI-MS/MS

En este ensayo se emplearon péptidos de HSA modificada por AX obtenidos a partir de la digestión con tripsina y tripsina/quimotripsina. Antes de cargar las muestras en el sistema de cromatografía líquida se añadió ácido fórmico a la mezcla de péptidos hasta una concentración final del 10%. 1  $\mu\text{l}$  de la muestra se inyectó en el sistema de nanocromatografía (UltiMate 3000 RSLCnano System, Dionex) y la mezcla peptídica se cargó en una columna de fase reversa (PicoFrit™ Column, HALO, C18, 2,7 microm, 100 Å, 75 microm i.d. x 10 cm, New Objective). Los péptidos se eluyeron a una velocidad de flujo constante de 300 nl/min.

El sistema de cromatografía líquida estaba conectado al espectrómetro de masas LTQ Orbitrap™ XL. La detección de los péptidos modificados por el fármaco y la identificación de los sitios de modificación se realizó mediante una estrategia compuesta por 2 pasos diferentes: el primer paso consistió en el análisis del espectro de MS/MS registrado en el modo de fragmentación de iones de disociación por colisión de alta energía (HCD) con el fin de encontrar los iones diagnósticos de este ensayo; y el siguiente paso consistió en comparar los iones precursores con una lista teórica de iones modificados generados a partir de la digestión virtual de la HSA con tripsina/quimotripsina.

**2.5.5. Identificación de proteínas séricas y celulares mediante MALDI-TOF-TOF MS y MS/MS**

La identificación de las proteínas de interés se realizó en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics).

Se identificaron muestras de proteínas séricas y celulares separadas por electroforesis bidimensional y sometidas a una digestión en gel con tripsina. 1  $\mu$ l cada muestra tripsinizada se depositó sobre una placa AnchorChip de 800  $\mu$ m (Bruker Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. 1  $\mu$ l de la solución matriz (3 mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) preparada en acetonitrilo al 33% con TFA al 0,1% se depositó sobre el producto de la digestión y se dejó secar a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron por espectrometría de masas y se tomaron 1000 scans para el análisis de huella peptídica y 2000 scans para el de MS/MS. Se realizó un análisis automatizado de los datos de masa usando el programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics). La calibración interna del análisis de MALDI-TOF MS se realizó usando 2 iones de autólisis de la tripsina con un valor de  $m/z$  de 842,510 y 2211,05 Da, y las calibraciones para el análisis de MALDI-TOF-TOF MS/MS se realizaron con fragmentos de iones obtenidos a partir de aductos protonados de una mezcla de péptidos que abarca un intervalo de valores  $m/z$  de 800-3200 Da. El error típico observado en la precisión de los valores de masa en la calibración era normalmente inferior a 20 ppm.

Los datos obtenidos por MALDI-MS y MS/MS se enviaron a través del programa BioTools 3.0 (Bruker Daltonics) al programa Mascot (Matrix Science) para efectuar la búsqueda en la base de datos pública de proteínas del NCBI (NCBI: 20100306). Los parámetros de búsqueda establecidos fueron los siguientes: enzima, tripsina; modificaciones, carbamidometil (C), oxidación (M); se permitió la pérdida de un corte triptico; tolerancia peptídica, 50 ppm; tolerancia MS/MS, 0,5 Da. Se consideraron significativas ( $p < 0,05$ ) puntuaciones de probabilidad superiores a 75.

## **2.6. Microscopía de fluorescencia**

Los macrófagos de ratón de la línea celular Raw264.7 (ATCC) se cultivaron en placas de 35 mm de diámetro con fondo de vidrio (Mat Tek Corporation) o sobre cubreobjetos de cristal. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,05% durante 10 minutos y se bloquearon con una solución de BSA al 1% (v/v) en PBS durante 20 minutos. Las células se incubaron con estreptavidina–Alexa Fluor 488 a 1  $\mu$ g/ml en PBS durante 30 minutos y con DAPI (Invitrogen) a 2  $\mu$ g/ml durante 20 minutos. Tras cada una de las incubaciones se hicieron varios lavados de 5-10 minutos con PBS. Las muestras

que se prepararon en cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje FluorSave<sup>TM</sup> Reagent (Calbiochem®, Merck Millipore).

Las células se observaron en un microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 disponible en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigaciones Biológicas. Se utilizó un objetivo de 63 aumentos y se obtuvieron secciones celulares cada 1 µm.

### 3. Soluciones, tampones y material fungible

#### 3.1. Soluciones y tampones

- Bicarbonato sódico 0,1 M
- Carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2)
- Gel poliacrilamida (concentrador): Acrilamida/bis-acrilamida, 1 M Tris (pH 6,8), H<sub>2</sub>O milliQ, SDS, persulfato amónico, TEMED. Los reactivos fueron suministrados por Bio-Rad y poseían un grado de pureza apto para ensayos de electroforesis.
- Gel poliacrilamida (separador): Acrilamida/bis-acrilamida, 1 M Tris (pH 8,8), H<sub>2</sub>O milliQ, SDS, persulfato amónico, TEMED. Los reactivos fueron suministrados por Bio-Rad y poseían un grado de pureza apto para ensayos de electroforesis.
- Tampón electroforesis: Tris 3,3 g/l, glicina 14,42 g/l y SDS 1 g/l (pH 8,3)
- Tampón equilibrado I para electroforesis bidimensional: urea 6 M, SDS 2 % (p/v), Tris 0,375 M (pH 8,8), glicerol 20 % y 130 mM DTT
- Tampón equilibrado II para electroforesis bidimensional: urea 6 M, SDS 2 % (p/v), Tris 0,375 M (pH 8,8), glicerol 20 % y 135 mM iodoacetamida
- Tampón estimulación para TAB: 2% HEPES (v/v), 0,78% NaCl (p/v), 0,04% KCl (p/v), 0,08% CaCl<sub>2</sub> (p/v), 0,03% MgCl<sub>2</sub> (p/v), 0,1% HSA (p/v), IL-3  $2 \times 10^{-3}$  µg/ml.
  - HEPES: Gibco
  - Interleuquina 3 (rhIL-3): R&D Systems
- Tampón fosfato salino (PBS): 0,8% NaCl (p/v), 0,02% KCl (p/v), 0,12% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (p/v), 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (p/v) (pH 7,4)
- Tampón lisis para homogeneización de células: Tris 10 mM (pH 7,5), 0,1 mM EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, inhibidores de proteasas y fosfatasa: pefablock 320 µg/ml, inhibidor de tripsina 2 µg/ml,

aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml, ortovanadato sódico 0,1 mM, fluoruro sódico 50 mM y SDS a una concentración final del 0,5% (p/v).

- Inhibidores de proteasas y fosfatas: Sigma-Aldrich y Roche
- SDS: Sigma-Aldrich
- Tampón purificación de HSA A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM (pH 7,1)
- Tampón purificación de HSA B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM (pH 7,1) + NaCl 1,4 M
- Tampón rehidratación para electroforesis bidimensional: tiourea 2 M, urea 7 M, CHAPS 4%, DTT 100 mM, azul de bromofenol y anfolitos 0,4%.
  - Anfolitos: Biolyte, Bio-Rad
- Tampón transferencia Ánodo I para transferencia semi-seca: Tris 0,3 M (pH 10,4); metanol 10% (v/v)
- Tampón transferencia Ánodo II para transferencia semi-seca: Tris 2,5 mM (pH 10,4); metanol 10% (v/v)
- Tampón transferencia Cátodo para transferencia semi-seca: Tris 25 mM (pH 9,4); ácido 6-aminohexanoico 40 mM; metanol 20% (v/v)
- Tampón Tris salino (TBS): Tris 20 mM, NaCl 500 mM (pH 7,5)

### **3.2. Material fungible**

- Cubreobjetos y portaobjetos
- Jeringas y agujas hipodérmicas: BD Plastipack<sup>TM</sup>, BD Biosciences
- Lancetas para pruebas intracutáneas
- Material plástico cultivos celulares: Falcon, BD Biosciences
- Placas 35 mm de diámetro (microscopía confocal): Mat Tek Corporation
- Tubos extracción de vacío con gel (8ml): Vacuette, Greiner bio-one
- Tubos extracción de vacío con heparina lítica (8 ml): Vacuette, Greiner bio-one
- Tubos poliestireno 12 x 75 mm (5 ml) para TAB: BD Falcon<sup>TM</sup>, BD Biosciences
- Tubos vidrio 12 x 75 mm (6 ml) para radioinmunoensayo: Griofols-Movaco

## **V. Resultados**

---



## 1. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX

La sensibilidad de las pruebas cutáneas y de los métodos *in vitro* empleados en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX no supera el 70% en el caso de las pruebas cutáneas (Torres *et al.*, 2001; Blanca *et al.*, 2007) y es inferior al 50% en los métodos diagnósticos *in vitro* (Torres *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2004; Blanca *et al.*, 2009), por lo que son necesarios nuevos estudios encaminados a mejorar la sensibilidad de estas pruebas para así conseguir reducir el número de casos en los que es necesario realizar la administración controlada del fármaco para poder obtener un diagnóstico.

En este trabajo se analizó la utilidad del uso de determinantes menores de la AX (ácido amoxiciloico y dicetopiperacina) en la mejora de la sensibilidad de las pruebas cutáneas y de las pruebas *in vitro*.

### 1.1. Obtención de determinantes menores de la AX

Los determinantes menores de la AX empleados en el estudio fueron el ácido amoxiciloico y la dicetopiperacina, obtenidos a partir de la hidrólisis y autoaminólisis de la AX respectivamente (Figura 30). Para determinar el grado de pureza de la AX, del ácido amoxiciloico y de la dicetopiperacina suministrados por los Laboratorios Diater se realizó un análisis por HPLC. Los resultados mostraron que el grado de pureza de la AX era del 91% y que contenía un 5,4% de un producto no identificado y trazas de ácido amoxiciloico. En el caso del ácido amoxiciloico, su grado de pureza era del 88%, con un 12% de un producto no identificado. Por último, el grado de pureza de la dicetopiperacina era del 92% y contenía un 8% de un producto no identificado (Tabla 16).

	Composición química (%)			
	Amoxicilina	Ácido amoxiciloico	Dicetopiperacina	Otros
Amoxicilina	91%	Trazas	-	5,4%
Ácido amoxiciloico	-	88%	-	12%
Dicetopiperacina	-	-	92%	8%

**Tabla 16:** Composición química (%) de la AX, del ácido amoxiciloico y de la dicetopiperacina determinada por HPLC.

## 1.2. Selección y clasificación de pacientes. Pruebas *in vivo*.

En el estudio se incluyeron 61 pacientes (28 hombres y 33 mujeres) diagnosticados de haber sufrido una reacción alérgica inmediata a AX (Tabla 17). La edad media de los pacientes era de 45,7 años (14-76 años) y el intervalo medio de tiempo transcurrido entre la reacción y el estudio alergológico fue de 24,6 meses (1-204 meses). De acuerdo con los síntomas clínicos, 44 pacientes desarrollaron anafilaxia y 17 tuvieron urticaria. 6 de los pacientes habían sufrido 2 episodios alérgicos con AX, mientras que el resto de pacientes habían experimentado un único episodio. Los fármacos involucrados en la reacción fueron la AX (n = 39) y la AX-CLV (n = 24).

**Tabla 17:** Características clínicas de los pacientes evaluados y resultados de las pruebas cutáneas realizadas con los determinantes clásicos de penicilina y los nuevos determinantes de la AX (se indica la concentración a la que se obtuvieron resultados positivos).

Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Fármaco	Interv tiempo (meses)	Nº episod	Pruebas cutáneas						
							Determinantes clásicos				Nuevos determinantes		
							PPL	MDM	BP	AX	AX	Axciloico	Dicetop
1A	M	40	Anafilaxia	AX-CLV	10	1	-	-	-	ID +	ID + 5 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
2A	M	49	Anafilaxia	AX-CLV	5	1	-	-	-	IC +	ID + 5 mg/ml	-	-
3A	H	64	Urticaria	AX	9	1	-	-	-	ID +	ID + 5 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
4A	M	20	Urticaria	AX	8	1	-	-	-	ID +	ID + 5 mg/ml	-	-
5A	H	38	Urticaria	AX	2	1	-	-	-	ID +	-	-	-
6A	M	52	Anafilaxia	AX-CLV	14	1	-	-	-	IC +	-	-	-
7A	M	33	Urticaria	AX	6	1	-	-	-	ID +	ID + 5 mg/ml	-	-
8A	M	39	Anafilaxia	AX-CLV	1	1	-	-	-	ID +	ID + 5mg/ml	-	-
9A	M	38	Urticaria	AX	36	1	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
10A	M	43	Anafilaxia	AX-CLV	36	1	-	-	-	IC +	ID + 5 mg/ml	-	-
11A	M	31	Anafilaxia	AX	36	1	-	-	-	IC +	-	-	-
12A	H	58	Anafilaxia	AX	8	1	-	-	-	ID +	-	-	-
13A	M	27	Anafilaxia	AX	3	1	-	-	-	ID +	ID + 5 mg/ml	-	-
14A	M	60	Anafilaxia	AX AX-CLV	3	2	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
15A	H	43	Anafilaxia	AX-CLV AX	2	2	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
16A	H	50	Anafilaxia	AX	24	1	-	-	-	ID +	-	-	-



Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Fármaco	Interv tiempo (meses)	Nº episod	Pruebas cutáneas						
							Determinantes clásicos				Nuevos determinantes		
							PPL	MDM	BP	AX	AX	Axciloico	Dicetop
17A	M	50	Anafilaxia	AX	3	1	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
18A	H	43	Anafilaxia	AX-CLV	5	1	-	-	-	ID +	IC + 10 mg/ml	-	-
19A	M	48	Anafilaxia	AX-CLV	70	1	-	-	-	ID +	IC + 10 mg/ml	ID + 1 mg/ml	ID + 10 mg/ml
20A	H	58	Anafilaxia	AX	6	2	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
21A	H	48	Anafilaxia	AX	36	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
22A	H	34	Anafilaxia	AX-CLV	5	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	-	-
23A	H	47	Anafilaxia	AX	84	1	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
24A	H	35	Anafilaxia	AX	4	1	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
25A	M	47	Anafilaxia	AX	12	1	-	-	-	ID +	-	-	-
26A	M	53	Anafilaxia	AX	2	1	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
27A	H	49	Anafilaxia	AX	5	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg/ml	ID + 10 mg/ml
28A	M	44	Anafilaxia	AX-CLV	6	2	-	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
29A	H	36	Anafilaxia	AX	5	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	-	-
30A	M	51	Anafilaxia	AX-CLV	24	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	-	-
31A	H	52	Anafilaxia	AX	8	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
32A	M	28	Anafilaxia	AX	24	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg	-
33A	M	37	Anafilaxia	AX-CLV	4	1	-	-	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 1 mg/ml	ID + 10 mg/ml
34B	H	14	Urticaria	AX	132	1	ID +	ID +	-	-	-	-	-
35B	M	25	Urticaria	AX-CLV	60	1	-	-	ID +	ID +	-	-	-
36B	M	25	Urticaria	AX	8	1	IC +	IC +	-	-	ID + 5 mg/ml	ID + 10 mg/ml	-
37B	M	65	Urticaria	AX-CLV	12	1	-	ID +	ID +	ID +	ID + 5 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
38B	H	34	Urticaria	AX	60	1	ID +	ID +	-	ID +	ID + 10 mg/ml	ID + 10 mg/ml	-
39B	M	74	Urticaria	AX	11	1	IC +	IC +	-	-	-	-	-
40B	H	76	Anafilaxia	AX-CLV	18	1	-	ID +	ID +	-	-	-	-
41B	M	43	Anafilaxia	AX	2	2	-	-	ID +	ID +	ID + 10 mg/ml	ID + 10 mg/ml	-
42B	H	64	Anafilaxia	AX-CLV	30	1	ID +	-	-	ID +	ID + 10 mg/ml	-	-
43B	H	67	Anafilaxia	AX	16	1	ID +	ID +	ID +	ID +	ID + 5 mg/ml	ID + 10 mg/ml	-
44B	H	56	Anafilaxia	AX	204	1	-	ID +	-	ID +	ID + 5 mg/ml	ID + 10 mg/ml	-

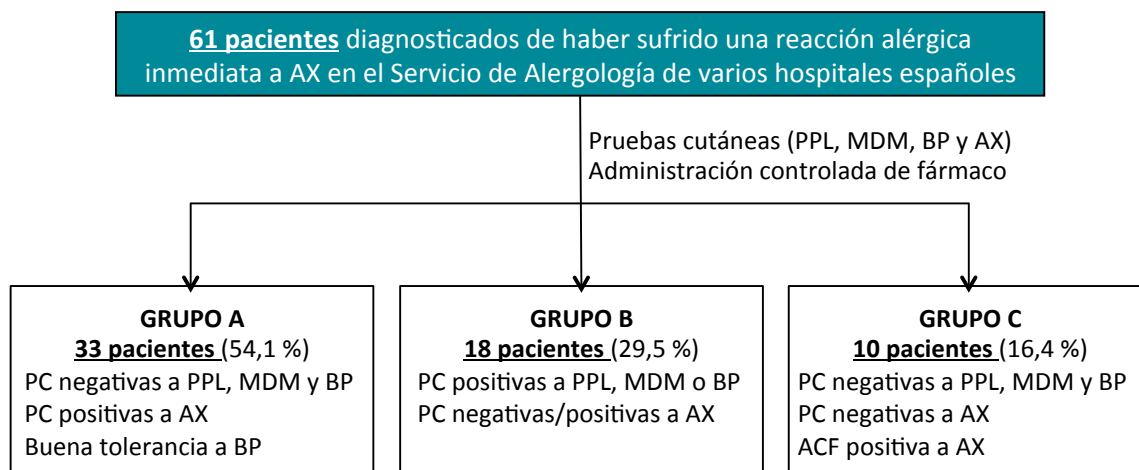
Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Fármaco	Interv tiempo (meses)	Nº episod	Pruebas cutáneas						
							Determinantes clásicos				Nuevos determinantes		
							PPL	MDM	BP	AX	AX	Axciloico	Dicetop
45B	M	53	Anafilaxia	AX-CLV	36	1	-	ID +	ID +	ID +	IC + 10 mg/ml	ID + 10 mg/ml	-
46B	M	67	Urticaria	AX	24	1	-	-	ID +	-	-	-	-
47B	M	47	Anafilaxia	AX-CLV	5	1	-	ID +	-	-	-	-	-
48B	H	68	Urticaria	AX	120	1	ID +	ID +	-	-	-	-	-
49B	H	48	Anafilaxia	AX-CLV	24	1	-	IC +	-	IC +	IC + 10 mg/ml	ID + 5 mg/ml	-
50B	M	58	Anafilaxia	AX-CLV	5	1	-	ID +	-	-	-	-	-
51B	H	66	Urticaria	AX	51	1	ID +	ID +	-	-	-	-	-
52C	M	15	Anafilaxia	AX	12	1	-	-	-	-	-	-	-
53C	H	31	Anafilaxia	AX	7	1	-	-	-	-	-	-	-
54C	H	57	Anafilaxia	AX-CLV	24	1	-	-	-	-	-	-	-
55C	M	44	Anafilaxia	AX	5	2	-	-	-	-	-	-	-
56C	M	21	Anafilaxia	AX-CLV	62	1	-	-	-	-	-	-	-
57C	M	61	Urticaria	AX	18	1	-	-	-	-	-	-	-
58C	H	59	Urticaria	AX-CLV	9	1	-	-	-	-	-	-	-
59C	H	23	Anafilaxia	AX	3	1	-	-	-	-	-	-	-
60C	M	38	Urticaria	AX	27	1	-	-	-	-	-	-	-
61C	H	42	Anafilaxia	AX	10	1	-	-	-	-	-	-	-

AX: amoxicilina; Axciloico: ácido amoxiciloico; BP: bencilpenicilina; Dicetop: dicetopiperacina; Episod: episodios; H: hombre; IC: prueba intracutánea; ID: prueba intradérmica; Interv: intervalo; M: mujer; MDM: mezcla de determinantes menores; Pac: paciente; PPL: peniciloil-polilisina.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas cutáneas realizadas con los determinantes clásicos de penicilina (PPL, MDM, BP y AX) y en la administración controlada del fármaco clasificamos a los 61 pacientes del estudio en 3 grupos (Figuras 40-41):

- Grupo A, pacientes con pruebas cutáneas positivas sólo a AX y buena tolerancia a BP, y por tanto considerados pacientes alérgicos selectivos a AX.
- Grupo B, pacientes con pruebas cutáneas positivas a PPL, MDM o BP, independientemente de los resultados obtenidos con AX, y considerados como pacientes alérgicos al grupo de las penicilinas.

- Grupo C, pacientes con pruebas cutáneas negativas a todos los determinantes y con una prueba de administración controlada de fármaco positiva a AX, considerados como pacientes con reacciones alérgicas selectivas a AX pero con pruebas cutáneas negativas.



**Figura 40:** Clasificación de los pacientes alérgicos a AX incluidos en el estudio atendiendo a los resultados obtenidos en las pruebas cutáneas (PC) y en la administración controlada del fármaco (ACF).

En el grupo A se incluyeron 33 pacientes (54,1%) con pruebas cutáneas positivas sólo a AX y con buena tolerancia a BP. Este grupo estaba compuesto por 14 hombres y 19 mujeres, con una edad media de 43,8 años (20-64 años) y el intervalo de tiempo medio entre la reacción y el estudio fue de 15,3 meses (1-84 meses). Con respecto al tipo de reacción, 28 de los pacientes sufrieron una reacción de anafilaxia y 5 tuvieron urticaria.

El grupo B estaba formado por 18 pacientes (29,5%) con pruebas cutáneas positivas a PPL, MDM o BP, independientemente de los resultados que se obtuvieron en las pruebas cutáneas con AX. De estos 18 pacientes, 8 tuvieron pruebas cutáneas positivas a PPL, 14 a MDM y 7 a BP. Atendiendo a la combinación de los distintos determinantes de BP, 6 pacientes tuvieron pruebas cutáneas positivas a PPL y MDM; 4 sólo a MDM; 3 a MDM y BP; 3 sólo a BP; 1 sólo a PPL y 1 a PPL, MDM y BP. El grupo estaba formado por 9 hombres y 9 mujeres, con una edad media de 52,8 años (14-76 años) y el intervalo de tiempo medio transcurrido entre la reacción y el estudio fue de 45,4 meses (2-204 meses). 9 de los pacientes sufrieron una reacción de anafilaxia y 9 desarrollaron urticaria.

En el grupo C se incluyeron 10 pacientes (16,4%) con pruebas cutáneas negativas a todos los determinantes y que desarrollaron síntomas después de la

administración controlada de AX. Este grupo estaba compuesto por 5 hombres y 5 mujeres con una edad media de 39,1 años (15-61 años) y el intervalo de tiempo medio entre la reacción y el estudio fue de 17,7 meses (3-62 meses). 7 de los pacientes tuvieron una reacción de anafilaxia y 3 de urticaria.

Posteriormente se realizaron pruebas cutáneas con los nuevos determinantes menores de la AX (ácido amoxiciloico y dicetopiperacina) y con la propia AX, y los resultados obtenidos fueron los siguientes (Figura 41):

En el grupo A, de los 33 pacientes que componían este grupo, 27 pacientes (81,8%) tuvieron resultados positivos a AX, 10 (30,3%) a ácido amoxiciloico, 3 (9,1%) a dicetopiperacina y 6 pacientes (18,2%) tuvieron resultados negativos a todos los determinantes de AX. Todos los pacientes con pruebas cutáneas positivas a ácido amoxiciloico y a dicetopiperacina tuvieron también pruebas cutáneas positivas a AX.

En el grupo B, de los 18 pacientes incluidos, 9 pacientes (50,0%) tuvieron resultados positivos a AX, 8 (44,4%) a ácido amoxiciloico, ninguno a dicetopiperacina y 9 pacientes (50,0%) tuvieron resultados negativos a todos los determinantes. Todos los pacientes con pruebas cutáneas positivas a ácido amoxiciloico eran también positivos a AX.

En el grupo C, los 10 pacientes incluidos (100%) tuvieron pruebas cutáneas con resultados negativos a los nuevos determinantes menores de AX.

61 pacientes diagnosticados de haber sufrido una reacción alérgica inmediata a AX en el Servicio de Alergología de varios hospitales españoles	<div><div>GRUPO A</div><div>33 pacientes (54,1 %)</div><div>PC negativas a PPL, MDM y BP</div><div>PC positivas a AX</div><div>Buena tolerancia a BP</div></div>	Número de pacientes con PC positivas														
		Determinantes clásicos								Nuevos determinantes						
		PPL		MDM		BP		AX		AX		Axciloico		Dicetop		
		0		0		0		33 (100%)		27 (81,8%)		10 (30,3%)		3 (9,1%)		
	IC 14		ID 19						IC 12		ID 15		IC 0		ID 3	
	<div><div>GRUPO B</div><div>18 pacientes (29,5 %)</div><div>PC positivas a PPL, MDM o BP</div><div>PC negativas/positivas a AX</div></div>	Determinantes clásicos								Nuevos determinantes						
		PPL		MDM		BP		AX		AX		Axciloico		Dicetop		
		8 (44,4%)		14 (77,8%)		7 (38,9%)		9 (50%)		9 (50%)		8 (44,4%)		0		
		IC 2		ID 6		IC 3		ID 11		IC 0		ID 7		IC 1		ID 8
	<div><div>GRUPO C</div><div>10 pacientes (16,4 %)</div><div>PC negativas a PPL, MDM y BP</div><div>PC negativas a AX</div><div>ACF positiva a AX</div></div>	Determinantes clásicos								Nuevos determinantes						
PPL		MDM		BP		AX		AX		Axciloico		Dicetop				
0		0		0		0		0		0		0				

**Figura 41: Número de pacientes con pruebas cutáneas positivas a los distintos determinantes.** ACF: administración controlada de fármaco; AX: amoxicilina; Axciloico: ácido amoxiciloico; BP: bencilpenicilina; Dicetop: dicetopiperacina; IC: prueba intracutánea;

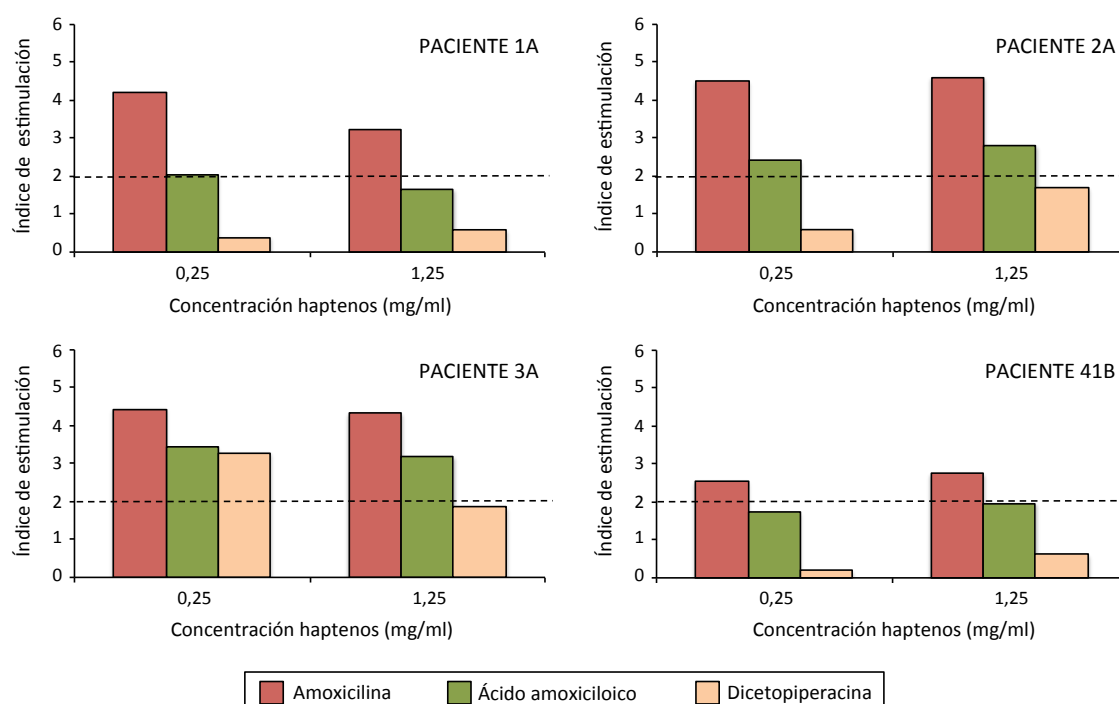
ID: prueba intradérmica; MDM: mezcla de determinantes menores; PC: pruebas cutáneas; PPL: peniciloil-polilisina.

Las pruebas cutáneas también se realizaron en todos los controles del estudio (N = 30) con los determinantes clásicos de penicilina y los nuevos determinantes menores de AX, y en todos los casos los resultados obtenidos fueron negativos tanto en las pruebas intracutáneas como intradérmicas.

### 1.3. Pruebas *in vitro*

#### 1.3.1. Test de activación de basófilos

El TAB se realizó en todos los pacientes de los grupos A y B (N = 51) empleando AX, ácido amoxiciloico y dicetopiperacina a varias concentraciones. El análisis de los resultados obtenidos mostró que de los 51 pacientes analizados, 26 pacientes (50,9%) tuvieron resultados positivos a AX, 15 pacientes (29,4%) a ácido amoxiciloico y 4 pacientes (7,8%) a dicetopiperacina. Como sucedió en las pruebas cutáneas, todos los casos positivos a ácido amoxiciloico o a dicetopiperacina fueron también positivos a AX (Figura 42). Se obtuvieron resultados negativos en el TAB realizado con estos determinantes en todos los controles del estudio (N = 30).



**Figura 42: TAB realizado con AX, ácido amoxiciloico y dicetopiperacina (0,25 y 1,25 mg/ml) en pacientes que habían sufrido una reacción alérgica inmediata a AX.** Se muestran los resultados de 4 pacientes representativos del ensayo para los que se obtuvieron resultados positivos a alguno de los determinantes.

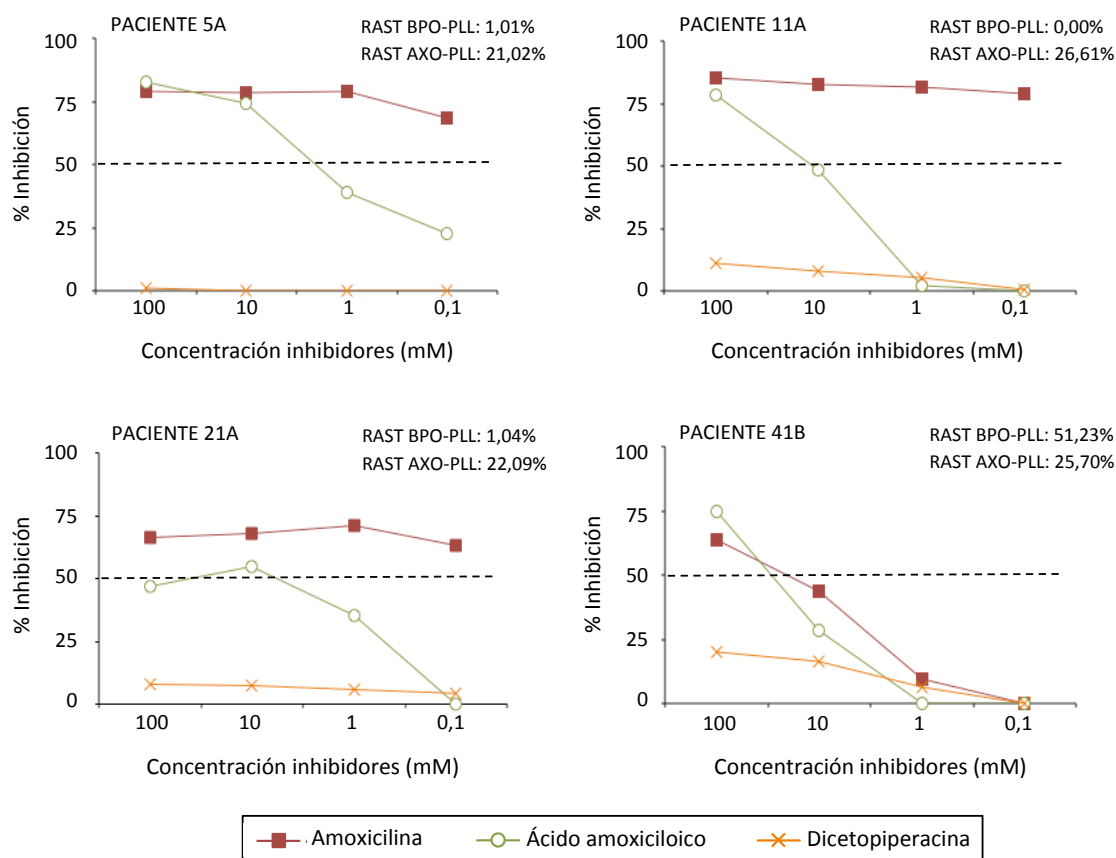
### 1.3.2. Inhibición del RAST

Los estudios de inhibición del RAST se realizaron con muestras de suero de pacientes de los grupos A y B que tenían un porcentaje de RAST para AXO-PLL superior al 7% (1A, 2A, 5A, 11A, 18A, 21A, 37B, 39B, 41B y 43B). Se emplearon como inhibidores AX, ácido amoxiciloico y dicetopiperacina para comparar el nivel de reconocimiento de los determinantes menores con respecto a la AX por los anticuerpos IgE específicos de estos pacientes.

En los pacientes selectivos a AX (grupo A) se observó que el porcentaje de inhibición decaía de una forma más pronunciada con el ácido amoxiciloico que con la AX conforme disminuía la concentración del inhibidor correspondiente, además la AX era el determinante para el que se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición lo que sugería que ésta era la principal estructura reconocida por los anticuerpos IgE específicos. En ninguno de los casos se obtuvo un porcentaje de inhibición significativo con la dicetopiperacina (Figura 43).

En los pacientes alérgicos a las penicilinas (grupo B) se observó que el valor del porcentaje de inhibición disminuía de forma paralela entre la AX y el ácido amoxiciloico conforme disminuía la concentración de cada uno de los inhibidores siendo generalmente superior el porcentaje de inhibición obtenido con la AX, lo que indicaba que la AX era la estructura reconocida principalmente por los anticuerpos IgE específicos aunque no de un modo tan claro como sucedía en los pacientes selectivos a AX. En ninguno de los casos se obtuvo un porcentaje de inhibición significativo con la dicetopiperacina (Figura 43).

Con respecto a los resultados de las pruebas cutáneas de los 10 pacientes a los que se les realizó la inhibición del RAST, 7 pacientes tenían pruebas cutáneas con resultados positivos a los nuevos determinantes menores de la AX (1A, 2A, 18A, 21A, 37B, 41B y 43B) y 3 tenían resultados negativos (5A, 11A y 39B). El modo en el que los determinantes menores eran reconocidos con respecto a la AX en los ensayos de inhibición del RAST era similar entre los pacientes incluidos en el mismo grupo, independientemente de los resultados de las pruebas cutáneas, además no se observaron diferencias en los resultados obtenidos en función del intervalo de tiempo transcurrido entre la reacción alérgica y el presente estudio.



**Figura 43: Ensayo de inhibición del RAST realizado en pacientes que habían sufrido una reacción alérgica inmediata a AX.** Se realizó con suero de pacientes con un porcentaje de RAST superior al 7% para AXO-PLL usando como fase sólida discos de celulosa conjugados con AXO-PLL y como inhibidores amoxicilina, ácido amoxiciloico y dicetopiperacina (0,1 - 100 mM). En la esquina superior derecha de cada gráfico aparece el porcentaje de RAST del paciente para BPO-PLL y AXO-PLL. Se muestran los resultados obtenidos en 4 pacientes representativos del estudio.

## 2. Evaluación de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por AX-CLV

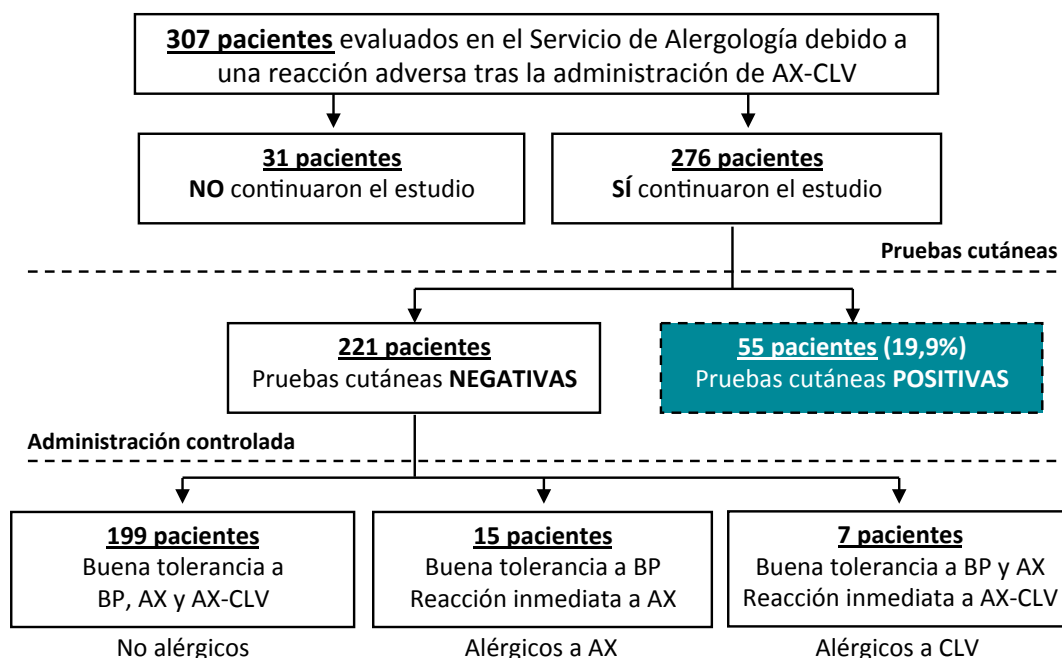
El consumo de la combinación AX-CLV en la población española ha experimentado un gran crecimiento desde su comercialización y previsiblemente este incremento continuará de forma progresiva durante los próximos años. Este hecho ha provocado un aumento en la incidencia de las reacciones alérgicas tras la administración de AX-CLV observándose en muchos de los casos una buena tolerancia a la AX, lo que hace necesaria la valoración de la relevancia del CLV como estructura responsable del desarrollo de este tipo de reacciones alérgicas.

En este estudio se analizó el porcentaje de reacciones alérgicas inmediatas a AX-CLV provocadas de forma selectiva por el CLV y la relevancia de incluir el CLV en

las pruebas cutáneas y en las pruebas *in vitro* ya que en la actualidad no está disponible comercialmente para su uso rutinario en la clínica.

### 2.1. Selección y clasificación de pacientes. Pruebas *in vivo*.

Se evaluó a un grupo inicial de 307 pacientes que habían desarrollado una reacción adversa tras la administración de AX-CLV, entre los cuales 31 pacientes finalmente no completaron el estudio. Dentro de los 276 pacientes restantes, 55 (19,9%) fueron diagnosticados de sufrir una reacción alérgica inmediata a AX-CLV con pruebas cutáneas positivas a diferentes determinantes BLs. Los 221 casos con pruebas cutáneas negativas (80,1%) se sometieron a una prueba de administración controlada de fármaco para poder ser diagnosticados y se obtuvieron los siguientes resultados: 199 pacientes (72,1%) toleraban hasta dosis terapéuticas la BP, AX y AX-CLV y se consideraron como no alérgicos; 15 (5,4%) mostraban buena tolerancia a la BP pero desarrollaron una reacción inmediata frente a la AX, por lo que se diagnosticaron como alérgicos a la AX; y 7 (2,5%) tenían buena tolerancia a la BP y a la AX pero desarrollaron una reacción inmediata tras la administración de AX-CLV y se diagnosticaron como alérgicos al CLV (Figura 44).



**Figura 44:** Selección y clasificación de pacientes que habían sufrido una reacción adversa tras la administración de AX-CLV en función de los resultados obtenidos en las pruebas cutáneas y en la administración controlada del fármaco.



Los pacientes con pruebas cutáneas positivas (N = 55) se sometieron a un análisis más detallado y en la tabla 18 se resumen sus características clínicas y los resultados de sus pruebas diagnósticas. Este grupo de pacientes estaba compuesto por 23 mujeres y 32 hombres, la edad media era de 43,27 años (18-67 años), el intervalo de tiempo medio transcurrido entre la reacción y el estudio alergológico fue de 6,09 meses (1-46 meses), y con respecto al tipo de reacción 45 pacientes sufrieron una reacción de anafilaxia y 10 tuvieron urticaria.

**Tabla 18:** Características clínicas y resultados de las pruebas cutáneas y de la administración controlada del fármaco de los pacientes incluidos en el estudio con pruebas cutáneas positivas (N = 55).

Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Interv tiempo (meses)	Pruebas cutáneas (aumento tamaño pápula en mm)					ACF	
					PPL	MDM	AX	CLV	AX-CLV	BP	AX
1A	M	61	Urticaria	6	ID + (3x3)	-	-	-	NH	NH	NH
2A	M	47	Urticaria	5	-	ID + (3x4)	ID + (5x6)	-	NH	NH	NH
3A	H	63	Anafilaxia	1	-	IC + (4x3)	IC + (4x4)	-	NH	NH	NH
4A	M	59	Anafilaxia	1	ID + (5x7)	ID + (4x6)	IC + (5x6)	-	NH	NH	NH
5A	H	48	Anafilaxia	18	-	IC + (4x5)	IC + (4x3)	-	NH	NH	NH
6B	M	49	Anafilaxia	4	-	-	ID+ (5x6)	-	NH	-	NH
7B	M	20	Urticaria	2	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
8B	H	37	Urticaria	9	-	-	ID + (3x3)	-	NH	-	NH
9B	M	55	Anafilaxia	5	-	-	ID + (4x6)	-	NH	-	NH
10B	M	41	Urticaria	7	-	-	ID + (3x3)	-	NH	-	NH
11B	H	42	Anafilaxia	4	-	-	ID + (5x7)	-	NH	-	NH
12B	M	52	Anafilaxia	6	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
13B	M	47	Anafilaxia	5	-	-	IC + (4x5)	-	NH	-	NH
14B	H	30	Anafilaxia	24	-	-	ID + (5x7)	-	NH	-	NH
15B	H	46	Anafilaxia	46	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
16B	M	19	Anafilaxia	12	-	-	ID + (4x6)	-	NH	-	NH
17B	H	57	Anafilaxia	2	-	-	IC + (4x5)	-	NH	-	NH

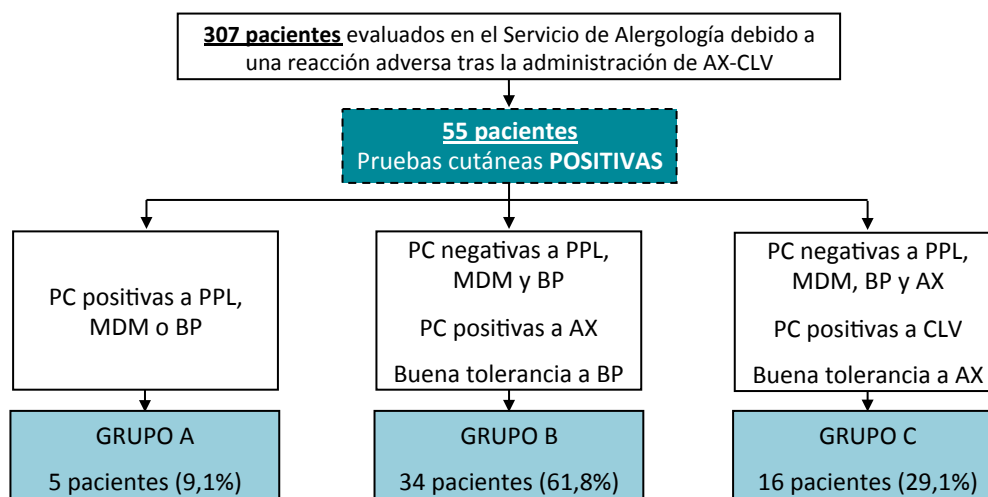
Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Interv tiempo (meses)	Pruebas cutáneas (aumento tamaño pápula en mm)					ACF	
					PPL	MDM	AX	CLV	AX-CLV	BP	AX
18B	M	45	Urticaria	4	-	-	ID + (3x3)	-	NH	-	NH
19B	H	46	Anafilaxia	6	-	-	ID + (5x6)	-	NH	-	NH
20B	H	31	Anafilaxia	5	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
21B	H	37	Anafilaxia	4	-	-	ID + (5x6)	-	NH	-	NH
22B	H	54	Anafilaxia	2	-	-	ID + (5x5)	-	NH	-	NH
23B	M	38	Anafilaxia	1	-	-	IC + (4x5)	-	NH	-	NH
24B	H	67	Anafilaxia	2	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
25B	H	46	Anafilaxia	1	-	-	IC + (4x6)	-	NH	-	NH
26B	M	60	Anafilaxia	1	-	-	IC + (4x5)	-	NH	-	NH
27B	H	60	Anafilaxia	1	-	-	ID + (5x6)	-	NH	-	NH
28B	H	18	Anafilaxia	2	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
29B	M	47	Anafilaxia	4	-	-	IC + (4x4)	-	NH	-	NH
30B	H	53	Urticaria	2	-	-	ID + (5x6)	-	NH	-	NH
31B	M	36	Anafilaxia	5	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
32B	H	41	Anafilaxia	4	-	-	ID + (5x6)	-	NH	-	NH
33B	H	35	Anafilaxia	6	-	-	ID+ (4x5)	-	NH	-	NH
34B	M	44	Anafilaxia	12	-	-	ID + (3x4)	-	NH	-	NH
35B	H	47	Anafilaxia	1	-	-	IC + (4x5)	-	NH	-	NH
36B	H	59	Anafilaxia	1	-	-	ID + (5x5)	-	NH	-	NH
37B	H	55	Anafilaxia	1	-	-	IC + (3x4)	-	NH	-	NH
38B	H	48	Anafilaxia	2	-	-	IC + (4x4)	-	NH	-	NH
39B	H	57	Anafilaxia	1	-	-	ID + (3x3)	-	NH	-	NH
40C	M	42	Anafilaxia	22	-	-	-	ID + (3x3)	ID + (3x4)	-	-
41C	H	26	Anafilaxia	5	-	-	-	ID + (3x5)	ID + (3x4)	-	-

Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Interv tiempo (meses)	Pruebas cutáneas (aumento tamaño pápula en mm)					ACF	
					PPL	MDM	AX	CLV	AX-CLV	BP	AX
42C	M	59	Anafilaxia	4	-	-	-	ID + (5x5)	ID + (3x4)	-	-
43C	H	18	Urticaria	2	-	-	-	IC + (5x6)	ID + (5x6)	-	-
44C	H	35	Anafilaxia	2	-	-	-	ID + (4x6)	ID + (4x4)	-	-
45C	M	56	Urticaria	12	-	-	-	ID + (5x6)	-	-	-
46C	H	42	Anafilaxia	1	-	-	-	IC + (4x4)	IC + (4x3)	-	-
47C	H	30	Anafilaxia	11	-	-	-	ID + (3x4)	-	-	-
48C	H	30	Anafilaxia	3	-	-	-	ID + (5x4)	ID + (3x4)	-	-
49C	H	18	Anafilaxia	1	-	-	-	ID + (4x6)	ID + (5x5)	-	-
50C	M	38	Anafilaxia	10	-	-	-	ID + (4x4)	-	-	-
51C	M	47	Urticaria	4	-	-	-	ID + (5x5)	-	-	-
52C	M	49	Anafilaxia	1	-	-	-	IC + (5x4)	IC + (3x4)	-	-
53C	H	28	Anafilaxia	7	-	-	-	ID + (6x4)	ID + (3x4)	-	-
54C	H	34	Anafilaxia	10	-	-	-	ID + (5x7)	-	-	-
55C	M	31	Anafilaxia	15	-	-	-	ID + (4x7)	-	-	-

ACF: administración controlada de fármaco; AX: amoxicilina; AX-CLV: amoxicilina-ácido clavulánico; CLV: ácido clavulánico; H: hombre; IC: prueba intracutánea; ID: prueba intradérmica; Interv: intervalo; M: mujer; MDM: mezcla de determinantes menores; NH: no hecho; Pac: paciente; PPL: peniciloil-polilisina.

Los 55 pacientes con pruebas cutáneas positivas se clasificaron en 3 grupos en función de los resultados obtenidos en las pruebas cutáneas y en la administración controlada del fármaco (Figura 45):

- Grupo A, pacientes con pruebas cutáneas positivas a determinantes mayores y menores de la BP.
- Grupo B, pacientes con pruebas cutáneas negativas a los determinantes mayores y menores de la BP y positivas a la AX y con buena tolerancia a la BP.
- Grupo C, pacientes con pruebas cutáneas negativas a los determinantes mayores y menores de la BP y a la AX, con buena tolerancia a la BP y a la AX y pruebas cutáneas positivas al CLV (Figura 46).

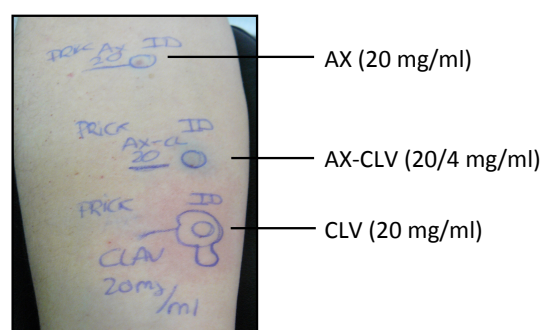


**Figura 45:** Número de pacientes con pruebas cutáneas (PC) positivas a alguno de los determinantes BLs incluidos en cada uno de los grupos del estudio.

En el grupo A se incluyeron 5 casos (9,1%), 3 mujeres y 2 hombres, la edad media era de 55,6 años (47-63 años), el intervalo de tiempo medio transcurrido entre la reacción y el estudio alergológico fue de 6,2 meses (1-18 meses), 3 de los pacientes sufrieron una reacción de anafilaxia y 2 tuvieron urticaria.

El grupo B estaba formado por 34 pacientes (61,8%), 13 mujeres y 21 hombres, la edad media era de 44,7 años (18-67 años), el intervalo de tiempo medio transcurrido entre la reacción y el estudio fue de 5,7 meses (1-46 meses), 29 de los pacientes sufrieron una reacción de anafilaxia y 5 tuvieron urticaria.

En el grupo C se incluyeron 16 casos (29,1%), 7 mujeres y 9 hombres, la edad media era de 36,4 años (18-59 años), el intervalo de tiempo medio entre la reacción y el estudio alergológico fue de 6,9 meses (1-22 meses), 13 de los pacientes sufrieron una reacción de anafilaxia y 3 tuvieron urticaria. En este grupo también se realizaron pruebas cutáneas con AX-CLV y se obtuvieron resultados positivos en 10 de los 16 casos.

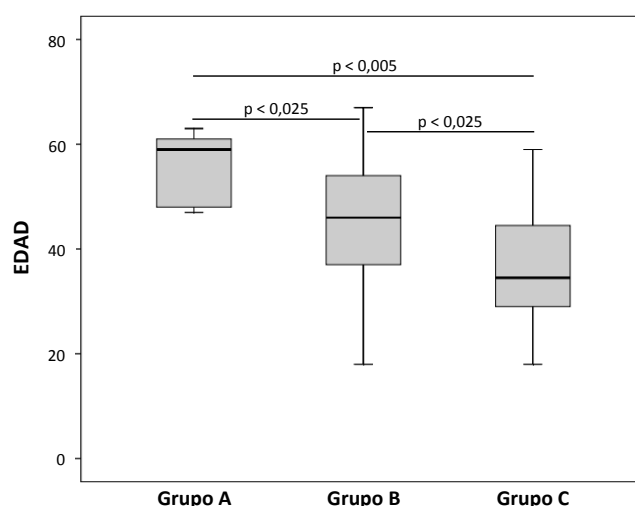


**Figura 46:** Prueba cutánea (intracutánea e intradérmica) con AX (20 mg/ml), AX-CLV (20/4 mg/ml) y CLV (20 mg/ml) en el paciente 55C. A la izquierda se muestran los

resultados de la prueba intracutánea (todos negativos) y a la derecha los resultados de la prueba intradérmica (sólo positiva a CLV).

## 2.2. Estudios comparativos entre grupos de pacientes

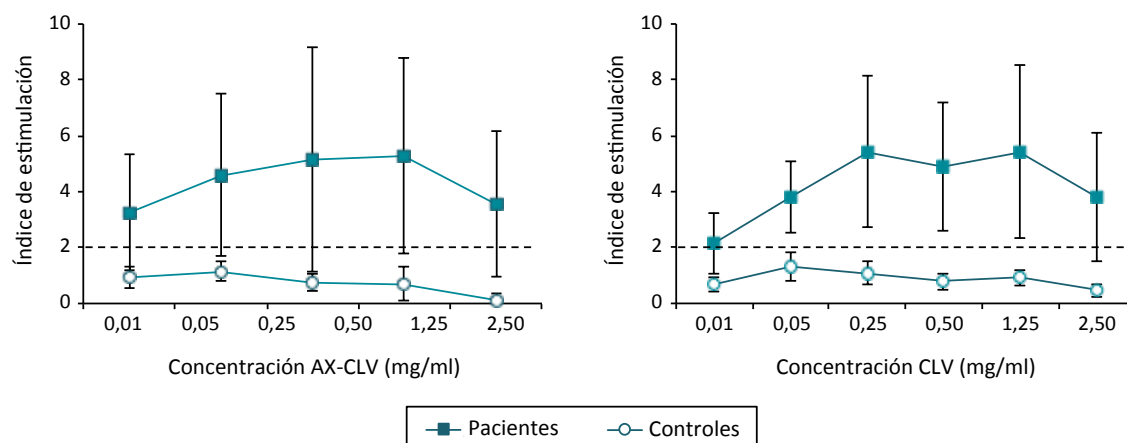
Se realizó un estudio comparativo entre los 3 grupos de pacientes con respecto a la edad y al intervalo de tiempo transcurrido entre la reacción y el estudio alergológico mediante métodos no paramétricos para más de dos variables independientes cuantitativas que no siguen una distribución normal (prueba de Kruskal Wallis). Los resultados mostraron diferencias significativas con respecto a la edad entre los pacientes del grupo A que eran los de mayor edad y los pacientes del grupo C que eran los más jóvenes. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos con respecto al intervalo de tiempo transcurrido entre la reacción y el estudio (Figura 47).



**Figura 47:** Estudio comparativo entre los tres grupos de pacientes con respecto a la edad. Los resultados se obtuvieron mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

## 2.3. Test de activación de basófilos

El TAB se realizó en todos los pacientes del estudio con pruebas cutáneas positivas (N = 55) y en controles sanos no alérgicos. Las concentraciones empleadas de los distintos haptenos se escogieron en función de ensayos de curva dosis-respuesta y de estudios de citotoxicidad celular en pacientes (N = 8) y en controles (N = 8). A partir de los resultados obtenidos se decidió utilizar la combinación AX-CLV a una concentración final de 0,3; 1,5 y 3 mg/ml y el CLV a una concentración final de 0,05; 0,25; 0,5 y 1,25 mg/ml (Figura 48).

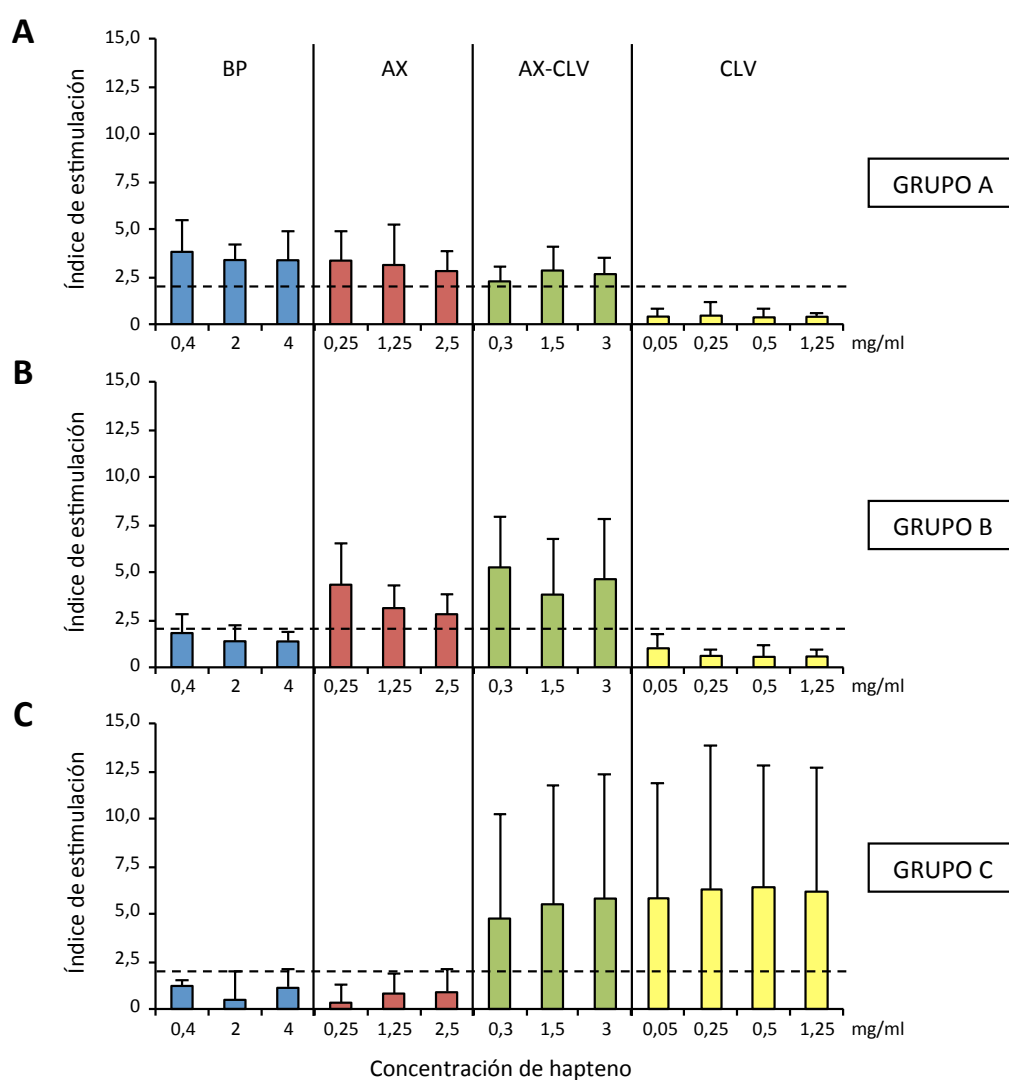


**Figura 48: Curva dosis-respuesta del TAB con AX-CLV y CLV realizado en pacientes alérgicos a CLV (N = 8) y controles sanos no alérgicos (N = 8).** Los resultados se expresan como la media del IE  $\pm$  la DE de los 8 pacientes y los 8 controles.

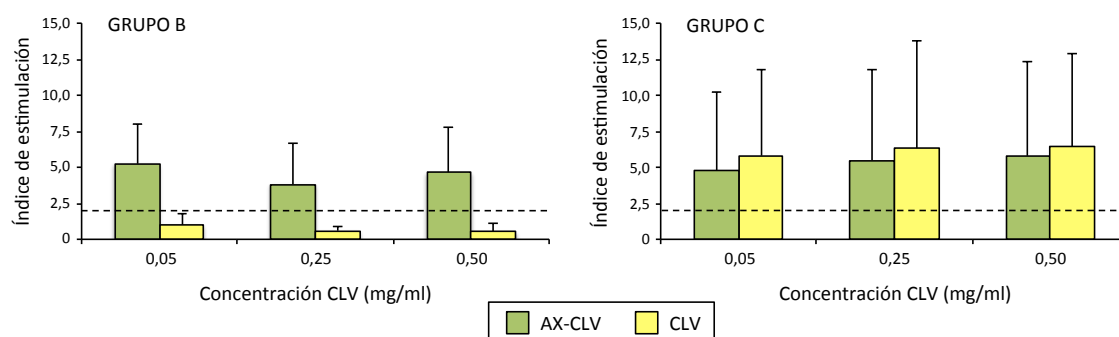
Entre los 55 pacientes a los que se les realizó el TAB con BP, AX, AX-CLV y CLV, se obtuvieron resultados positivos para al menos uno de los haptenos citados en 29 casos (52,7%): 3 de los 5 casos del grupo A (60%), 18 de los 34 casos del grupo B (52,9%) y 8 de los 16 casos del grupo C (50%). Los pacientes del grupo A eran positivos a BP, AX y AX-CLV, pero negativos a CLV; los pacientes del grupo B eran positivos a AX y AX-CLV, pero negativos a BP y CLV; y en el grupo C los pacientes eran positivos a AX-CLV y CLV (Figura 49). Al comparar los valores del IE obtenidos con AX-CLV y CLV a la misma concentración de CLV (Figura 50), confirmamos que todos los pacientes del grupo B eran positivos a AX-CLV pero negativos al CLV, mientras que en el grupo C los resultados del TAB eran similares con AX-CLV y con CLV lo que indicaba que estos pacientes respondían exclusivamente al CLV.

Los resultados obtenidos en el TAB coincidían con los obtenidos previamente en las pruebas cutáneas y con la clasificación de estos pacientes como alérgicos al grupo de las penicilinas (grupo A), alérgicos selectivos a la AX (grupo B) y alérgicos selectivos al CLV (grupo C).

El TAB también se realizó en un grupo de 30 individuos sanos no alérgicos con buena tolerancia a la AX-CLV y con pruebas cutáneas negativas. Los valores de especificidad del TAB obtenidos en este estudio fueron del 90% para la BP y del 86,6% para la AX, la AX-CLV y el CLV.



**Figura 49: TAB realizado con BP, AX, AX-CLV y CLV en pacientes que habían sufrido una reacción alérgica inmediata a AX-CLV.** Los resultados se expresan como la media del IE  $\pm$  la DE de los 29 casos con TAB positivo para al menos uno de los haptenos empleados.



**Figura 50: TAB realizado con AX-CLV y CLV en los pacientes de los grupos B y C.** Los resultados se expresan como la media del IE  $\pm$  la DE de los casos con TAB positivo en estos dos grupos y la concentración de AX-CLV se expresa como la concentración de CLV en la combinación AX-CLV.

## **2.4. Confirmación de la respuesta alérgica frente al CLV como una reacción mediada por IgE**

Hasta el momento no es posible detectar ni cuantificar por métodos directos los anticuerpos IgE específicos frente al CLV por lo que se trató de demostrar por otros métodos que las reacciones alérgicas selectivas a CLV observadas en los pacientes de este estudio estaban mediadas por IgE. Las aproximaciones empleadas fueron la inhibición de la activación de los basófilos con un inhibidor selectivo de la vía de activación mediada por IgE y el seguimiento del TAB a lo largo del tiempo en varios pacientes selectivos al CLV (grupo C).

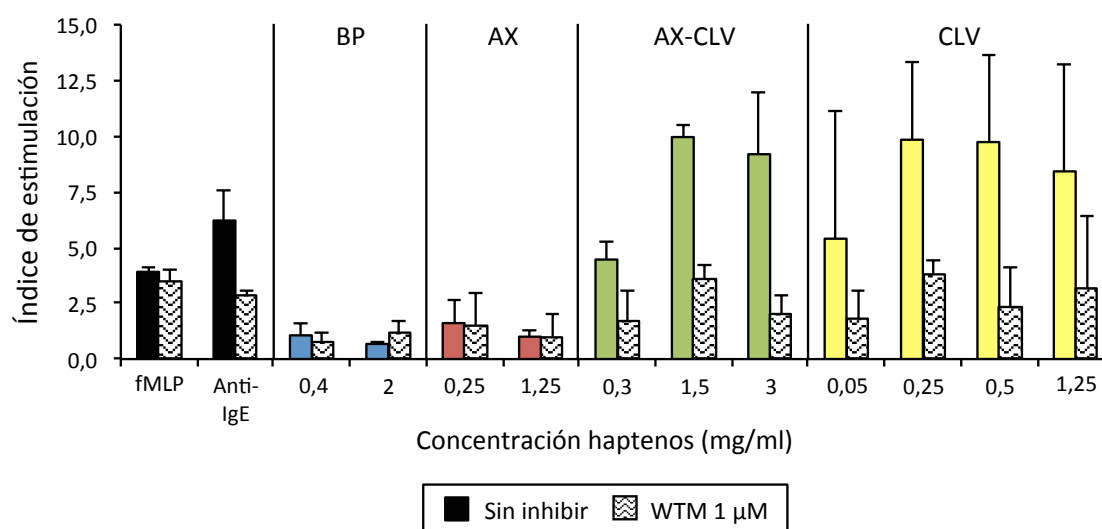
### **2.4.1. Inhibición del test de activación de basófilos con wortmanina**

La wortmanina (WTM) es un inhibidor potente y específico de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K). La PI3-K es una enzima clave en la cascada de transducción de señales que interviene en la degranulación de los basófilos cuando son activados en presencia de un determinado antígeno por un mecanismo mediado por IgE (Tedeschi *et al.*, 2000). Por ello para demostrar que los resultados positivos obtenidos con el CLV estaban asociados a un mecanismo mediado por IgE se utilizó la WTM en el TAB como inhibidor selectivo de esta vía de activación.

La concentración de WTM empleada en la inhibición del TAB se determinó a partir de ensayos con varias concentraciones del inhibidor (0,5; 1 y 5  $\mu$ M) estimulando los basófilos en presencia del anticuerpo anti-IgE (control positivo de la vía de activación de los basófilos mediada por IgE) y del péptido fMLP (control positivo de la activación de los basófilos por una vía no mediada por IgE). Se observó que la concentración óptima de WTM para conseguir inhibir la vía de activación mediada por IgE sin afectar a la activación por otras vías era 1  $\mu$ M.

Se realizó la inhibición del TAB con WTM en 4 pacientes de selectivos al CLV (grupo C) para los que se había obtenido previamente un resultado positivo del TAB al CLV (45C, 47C, 52C y 53C). Se observó una disminución del IE de los basófilos con respecto al control sin inhibir cuando eran estimulados en presencia del CLV (solo o combinado con AX) y del anticuerpo anti-IgE, y no se observó esta inhibición en presencia del péptido fMLP (Figura 51).



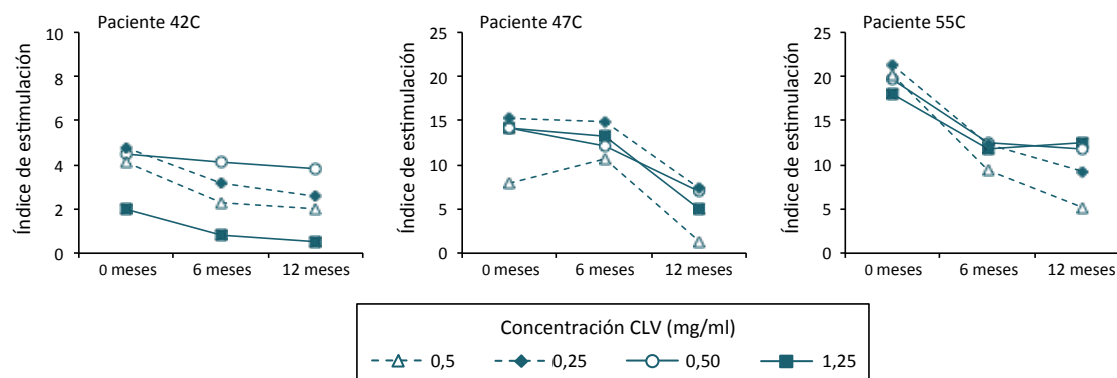


**Figura 51: Inhibición del TAB con WTM en pacientes con un TAB positivo a CLV.** La inhibición se realizó con WTM a 1 µM y los resultados se compararon con los obtenidos en un mismo ensayo sin inhibir. Los resultados se muestran como la media del IE  $\pm$  la DE para 4 pacientes alérgicos selectivos a CLV (grupo C).

#### 2.4.2. Negativización del test de activación de basófilos a lo largo del tiempo

En estudios previos se ha descrito que en pacientes alérgicos a antibióticos BLs los niveles de anticuerpos IgE específicos tienden a disminuir con el transcurso del tiempo desde el momento en el que tuvo lugar la reacción alérgica (Posadas *et al.*, 1997; Blanca *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2009). Según estos antecedentes, en el presente estudio se decidió realizar el seguimiento a lo largo del tiempo de los resultados del TAB en varios pacientes selectivos a CLV (grupo C) con resultados iniciales positivos para evaluar la posible disminución de los niveles de IgE específica frente a CLV y así confirmar que las reacciones a CLV descritas en el estudio eran mediadas por IgE.

Se realizó el seguimiento a lo largo del tiempo de los resultados del TAB de 3 pacientes del grupo C (42C, 47C y 55C) que al inicio del estudio alergológico tenían un TAB con resultados positivos a AX-CLV y CLV. Se repitió el TAB en estos pacientes después de un intervalo de tiempo de 6 y 12 meses y se observó una disminución progresiva en el IE de los basófilos a lo largo del tiempo (Figura 52).



**Figura 52: TAB realizado con CLV en pacientes selectivos a CLV (grupo C) durante un período de seguimiento de 12 meses.** Los resultados se expresan como el IE de los basófilos frente a diferentes concentraciones de CLV al inicio del estudio alergológico y tras un intervalo de tiempo de 6 y 12 meses.

### 3. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX

Analizar la importancia que puede tener la naturaleza de las macromoléculas portadoras de los antibióticos BLs en la conformación del determinante antigénico y en su reconocimiento por el SI puede aportar la información necesaria para conseguir mejorar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas.

En este estudio se analizaron mediante ensayos de inhibición del RAST posibles variaciones en el grado de reconocimiento de la AX por anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a la AX en función de la molécula portadora a la que se había conjugado previamente el fármaco.

#### 3.1. Selección de pacientes

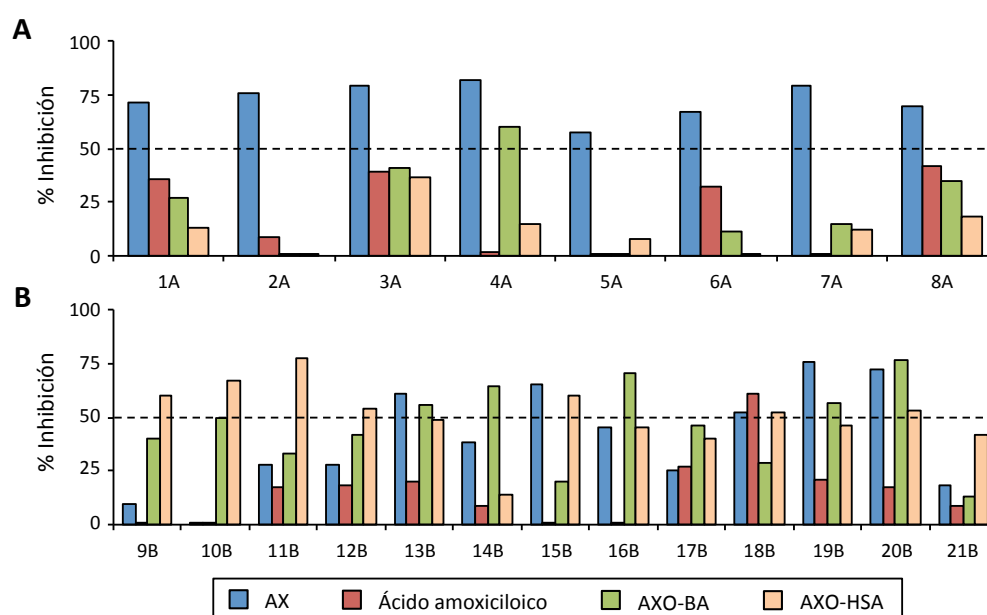
En el estudio se incluyeron 21 pacientes diagnosticados de haber sufrido una reacción alérgica inmediata a AX siguiendo el procedimiento diagnóstico descrito en el protocolo ENDA (Torres *et al.*, 2003) y que tenían un porcentaje de RAST a AXO-PLL superior al 7% (Tabla 19).

#### 3.2. Inhibición del RAST

Los ensayos de inhibición del RAST se realizaron con muestras de suero de los 21 pacientes incluidos en el estudio, empleando como fase sólida discos de celulosa conjugados a AXO-PLL y como inhibidores AX, ácido amoxiciloico, AXO-BA (0,1–100 mM) y AXO-HSA (1-30 mg/ml de HSA). A partir de los resultados obtenidos se

podieron distinguir 2 patrones de reconocimiento de la IgE específica a AX en función de los cuales se clasificaron a los pacientes en 2 grupos (Tabla 19).

- Grupo A, formado por pacientes que reconocían mejor la AX sin conjugar previamente a ninguna molécula portadora que la AXO-BA, AXO-HSA o el ácido amoxiciloico (Figura 53A).
- Grupo B, compuesto por pacientes que reconocían de forma similar o peor la AX sin conjugar previamente a ninguna molécula portadora con respecto a la conjugada a BA y/o a HSA, con un menor reconocimiento en general del ácido amoxiciloico (Figura 53B).



**Figura 53: Ensayo de inhibición del RAST realizado en pacientes que han sufrido una reacción alérgica inmediata a AX.** Se realizó con suero de pacientes con un porcentaje de RAST superior al 7% para AXO-PLL usando como fase sólida discos de celulosa conjugados con AXO-PLL. Se muestran los porcentajes de inhibición del RAST obtenidos con los inhibidores AX (1 mM), ácido amoxiciloico (1 mM), AXO-BA (1 mM) y AXO-HSA (5 mg/ml de HSA). **A:** Resultados de la inhibición del RAST para pacientes del grupo A; **B:** Resultados de la inhibición del RAST para pacientes del grupo B.

En el grupo A se incluyeron 8 pacientes, 4 hombres y 4 mujeres, con una edad media de 43,6 años (35-51 años) y el intervalo de tiempo medio transcurrido entre la reacción y el estudio fue de 9,6 meses (3-19 meses). Con respecto al tipo reacción desarrollada, 1 paciente sufrió un choque anafiláctico, 4 pacientes desarrollaron una reacción de anafilaxia y 3 pacientes tuvieron urticaria. Todos los pacientes de este grupo eran alérgicos selectivos a la AX, con unos resultados del RAST positivos sólo a AXO-PLL.

En el grupo B se incluyeron 13 pacientes, 5 hombres y 8 mujeres, con una edad media de 42,9 años (19-65 años) y el intervalo de tiempo medio transcurrido entre la reacción y el estudio fue de 3,3 meses (1-10 meses). Con respecto al tipo reacción desarrollada, 2 pacientes sufrieron un choque anafiláctico, 8 pacientes desarrollaron una reacción de anafilaxia y 3 pacientes tuvieron urticaria. Todos los pacientes de este grupo eran alérgicos a la AX con reactividad cruzada entre otras penicilinas, en los que los resultados del RAST eran positivos a BPO-PLL y a AXO-PLL.

**Tabla 19:** Clasificación y características clínicas de los pacientes diagnosticados de haber sufrido una reacción alérgica inmediata a AX incluidos en el estudio.

Pac	Sexo	Edad (años)	Reacción	Fármaco	Interv tiempo (meses)	Pruebas cutáneas			% RAST	
						PPL	MDM	AX	BPO-PLL	AXO-PLL
1A	M	35	Anafilaxia	AX	7	-	-	+	1,09	21,79
2A	H	45	Anafilaxia	AX-CLV	19	-	-	+	1,68	29,68
3A	M	42	Urticaria	AX	8	-	-	-	0,93	21,01
4A	H	43	Anafilaxia	AX-CLV	5	-	-	+	0,00	25,58
5A	M	51	Urticaria	AX-CLV	11	-	-	+	0,31	23,61
6A	H	47	Choque anafiláctico	AX-CLV	15	-	-	+	0,00	15,37
7A	H	38	Anafilaxia	AX-CLV	3	-	-	+	0,00	16,42
8A	M	48	Urticaria	AX	9	-	-	+	2,56	33,72
9B	M	19	Anafilaxia	Penicilina	5	-	-	+	51,17	26,30
10B	M	33	Anafilaxia	AX-CLV	2	+	-	+	16,35	19,75
11B	H	65	Urticaria	AX	10	-	-	+	14,74	14,31
12B	H	50	Choque anafiláctico	AX	2	-	-	+	16,85	17,13
13B	M	40	Anafilaxia	AX-CLV	1	+	-	-	23,90	16,58
14B	M	37	Anafilaxia	AX	4	+	+	+	41,84	60,43
15B	H	26	Anafilaxia	AX	1	-	-	+	6,87	21,62
16B	M	40	Choque anafiláctico	AX	5	-	-	+	14,60	11,50
17B	M	57	Urticaria	AX	6	+	+	+	25,53	28,92
18B	M	61	Urticaria	AX-CLV	2	-	-	+	39,96	42,82
19B	H	51	Anafilaxia	AX	1	-	-	+	16,33	23,20
20B	H	19	Anafilaxia	AX	3	-	-	+	15,23	10,33
21B	M	60	Anafilaxia	AX-CLV	1	-	-	+	33,28	19,89

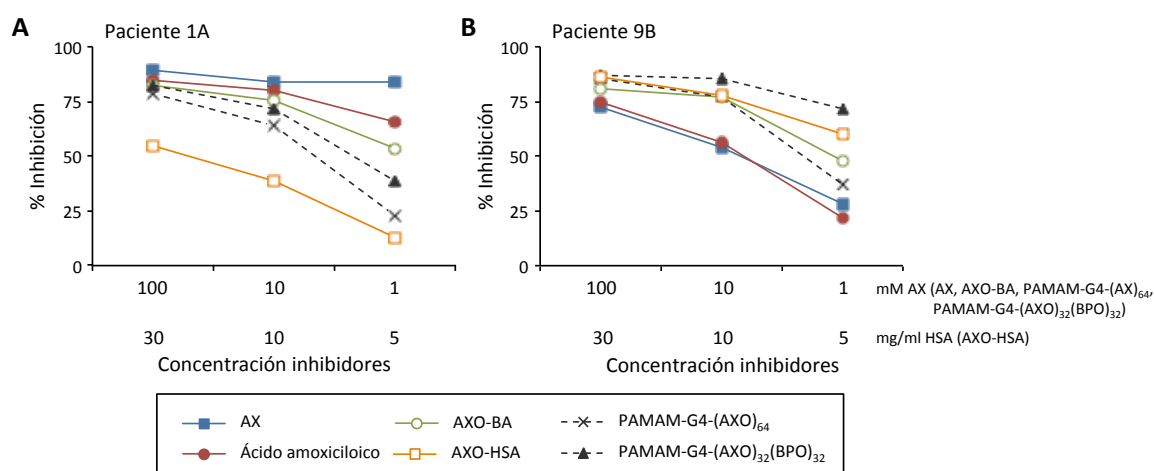
AX: amoxicilina; AX-CLV: amoxicilina-ácido clavulánico; H: hombre; Interv: intervalo; M: mujer; MDM: mezcla de determinantes menores; Pac: paciente; PLL: poli-L-lisina; PPL: penicioil-polilisina

Los ensayos de inhibición del RAST se repitieron con un caso representativo de cada grupo (1A y 9B) incluyendo como inhibidores moléculas de AX y BP

conjugadas a dendrímeros PAMAM de generación 4: PAMAM-G4-(AXO)<sub>32</sub>(BPO)<sub>32</sub> y PAMAM-G4-(AXO)<sub>64</sub>.

En el paciente 1A el porcentaje de inhibición obtenido con AX sin conjugar previamente a una estructura portadora fue superior al obtenido con la AX conjugada a las estructuras dendriméricas o al resto de estructuras químicas del ensayo, observándose que a la menor concentración empleada del inhibidor (1 mM) el porcentaje de inhibición no disminuía en el caso de la AX sin conjugar previamente una estructura portadora mientras que comenzaba a decaer con el resto de inhibidores (Figura 54A).

En el paciente 9B el porcentaje de inhibición obtenido con la AX conjugada a las estructuras dendriméricas disminuía paralelamente al del resto de estructuras al disminuir la concentración del inhibidor, incluyendo la AX sin conjugar previamente una estructura portadora (Figura 54B).



**Figura 54: Ensayo de inhibición del RAST realizado en pacientes que han sufrido una reacción alérgica inmediata a AX.** Se realizó con suero de los pacientes 1A y 9B usando como fase sólida discos de celulosa conjugados con AXO-PLL y como inhibidores AX, ácido amoxiciloico, AXO-BA, AXO-HSA, PAMAM-G4-(AXO)<sub>64</sub> y PAMAM-G4-(AXO)<sub>32</sub>(BPO)<sub>32</sub>. **A:** Resultados de la inhibición del RAST para el paciente 1A; **B:** Resultados de la inhibición del RAST para el paciente 9B.

Debido a las diferencias observadas en el reconocimiento de la AX conjugada a diferentes estructuras entre los pacientes alérgicos selectivos a AX y alérgicos con reactividad cruzada entre penicilinas, tratamos de profundizar en la relevancia que puede tener la naturaleza de la molécula portadora en los aductos fármaco-proteína como estructuras inmunogénicas y en su reconocimiento por el SI. Para ello decidimos identificar diferentes dianas séricas y celulares que podrían intervenir en

los procesos de haptización por AX y caracterizar los aductos de HSA modificada por AX, tal y como se describe en los próximos apartados.

#### **4. Desarrollo de abordajes para la detección de proteínas séricas y celulares modificadas por AX**

##### **4.1. Detección inmunológica de HSA modificada por AX mediante Western blot con varios anticuerpos anti-BL**

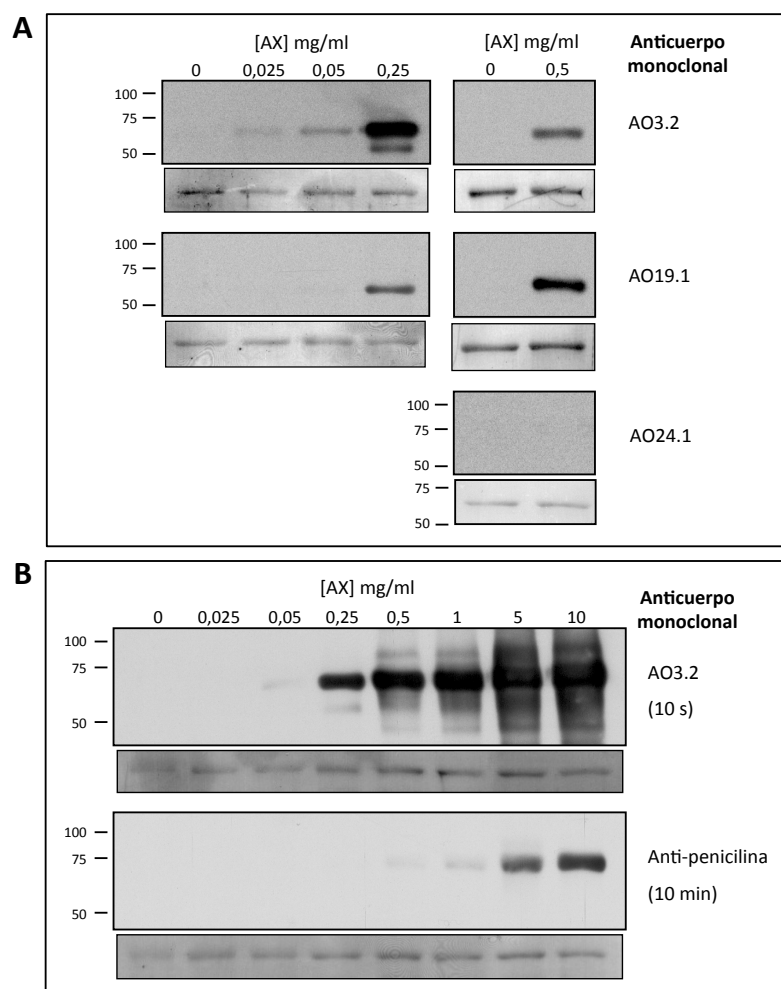
En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se obtuvieron varios anticuerpos monoclonales empleando como inmunógeno HSA modificada en presencia de altas concentraciones de AX (Mayorga *et al.*, 1995). Mediante estudios de competición de ELISA realizados con varias regiones de la molécula de AX se pudieron caracterizar estos anticuerpos y se observó que reconocían preferentemente diferentes partes de la molécula. En el presente trabajo evaluamos la capacidad de varios de estos anticuerpos monoclonales para detectar HSA modificada por AX mediante Western blot ya que todavía no se ha documentado la detección de aductos AX-proteína por Western blot. Las muestras empleadas en el ensayo se analizaron previamente por MALDI-TOF MS para comprobar que la HSA se había modificado por la AX.

Como se puede observar en la figura 55A, con los anticuerpos monoclonales AO3.2 y AO19.1 se detectó de forma selectiva la HSA modificada por AX. Estos dos anticuerpos son selectivos frente a AX y aunque se han generado frente a su cadena lateral es necesaria la presencia de la molécula completa del antibiótico para que el reconocimiento sea óptimo. Con el anticuerpo AO3.2 se detectó la HSA modificada en presencia de AX a una concentración de 0,025 mg/ml, que está dentro del rango de concentración que se puede alcanzar tras la administración de dicho fármaco (Serrano *et al.*, 1989; Hoizey *et al.*, 2002), por lo que este procedimiento era de alta sensibilidad. Con el anticuerpo AO19.1 también se logró la detección de los aductos de HSA con AX pero con una menor sensibilidad.

Por el contrario, no se obtuvo señal con el resto de anticuerpos monoclonales ensayados, AO24.1 (Figura 55A), AO14.1 y AO18.2 (resultados no mostrados), aunque previamente habían mostrado inmunoreactividad en el ELISA directo y en la inhibición del ELISA usando proteína exhaustivamente modificada por AX como antígeno (Mayorga *et al.*, 1995). Los anticuerpos AO18.2 y AO24.1 son anticuerpos específicos frente a la cadena lateral de la AX, su producción ha sido inducida por el

determinante antigénico que conforma la estructura química de su cadena lateral. El anticuerpo AO14.1 es un anticuerpo selectivo de la cadena lateral de las penicilinas, su producción ha sido inducida por el determinante antigénico que conforma la cadena lateral de la AX pero presenta una alta reactividad cruzada con las cadenas laterales de otras penicilinas, como son la AMP y la BP, y no tiene capacidad para reaccionar frente a la región nuclear de la molécula.

Además se comparó la capacidad de reconocimiento del anticuerpo AO3.2 con respecto a un anticuerpo monoclonal comercial anti-penicilina. Este anticuerpo comercial mostró una sensibilidad mucho más baja para la detección de los aductos HSA-AX que el anticuerpo AO3.2 y, usado a la misma concentración, sólo se pudo detectar HSA modificada en presencia de altas concentraciones de AX después de largas exposiciones de tiempo de la película de autorradiografía (Figura 55B).



**Figura 55: Detección inmunológica de HSA modificada por AX mediante Western blot con varios anticuerpos anti-BL.** HSA preparada en bicarbonato sódico 0,1 M se incubó durante 16 horas a 37°C con AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) en

una relación molar HSA:AX comprendida entre 1:0,46 y 1:183 (concentración final de HSA de 10 mg/ml y de AX comprendida entre 0,025 y 10 mg/ml). Alícuotas de 2 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con los anticuerpos indicados en la figura y detección por ECL. **A:** Detección de aductos HSA-AX por incubación con los anticuerpos AO3.2, AO19.1 y AO24.1. **B:** Detección de aductos HSA-AX por incubación con el anticuerpo AO3.2 y un anticuerpo monoclonal comercial anti-penicilina. A la derecha se indica el tiempo de exposición de las películas para la detección de la señal. Los paneles inferiores muestran en cada caso la tinción de proteína total con Coomassie. Los resultados son representativos de 4 ensayos en los que se obtuvieron resultados similares.

## **4.2. Empleo de AX biotinilada para la modificación de proteínas séricas**

Se estudió la posibilidad de emplear AX biotinilada en la modificación de proteínas séricas y celulares como otra herramienta para el estudio de la modificación de proteínas por AX, ya que la AX biotinilada se podría detectar con una gran sensibilidad mediante Western blot usando estreptavidina conjugada con peroxidasa o mediante microscopía de fluorescencia empleando estreptavidina conjugada con un fluorocromo. Además este reactivo podría ser de gran utilidad para el estudio de muestras complejas como suero y lisados celulares al poder purificar las proteínas modificadas mediante columnas de estreptavidina. Sin embargo, dada la alteración que provoca la introducción de la molécula de biotina es necesario realizar en primer lugar una caracterización de la AX biotinilada para comprobar cómo afecta funcionalmente a la AX así como a su reconocimiento por los anticuerpos anti-AX empleados en el apartado anterior.

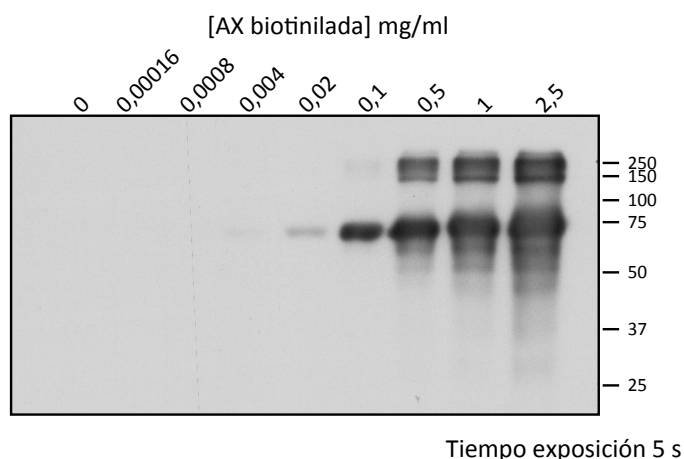
### **4.2.1. Detección de HSA modificada por AX biotinilada mediante Western blot**

#### **a) Dosis-respuesta**

Para este ensayo se generaron *in vitro* aductos de HSA con AX biotinilada en condiciones de pH básico empleando concentraciones crecientes de AX biotinilada. Tras la detección de estos aductos mediante Western blot con estreptavidina conjugada con peroxidasa se observó que la modificación de la HSA era dependiente de la concentración de AX biotinilada empleada. La modificación se detectó con una alta sensibilidad puesto que fue posible detectar los aductos generados en presencia de concentraciones bajas de AX biotinilada (4 µg/ml) para tiempos de exposición de las películas de autorradiografía muy cortos (Figura 56) e incluso se pudo detectar



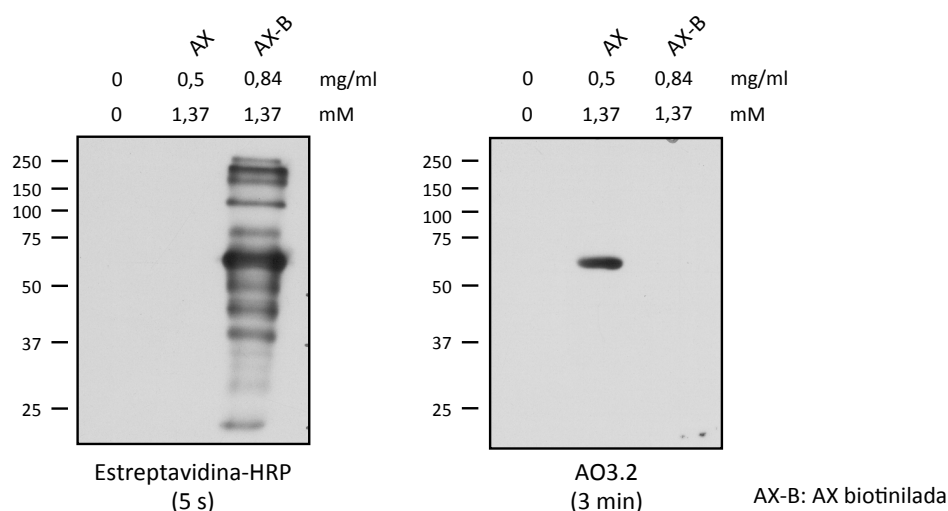
señal inmunorreactiva para la menor concentración de AX biotinilada empleada (0,16 µg/ml) aumentando los tiempos de exposición.



**Figura 56: Detección de HSA modificada en presencia de dosis crecientes de AX biotinilada mediante Western blot.** HSA preparada en bicarbonato sódico 0,1 M se incubó durante 16 horas a 37°C en presencia de AX biotinilada preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) en una relación molar HSA:AX biotinilada comprendida entre 1:0,0017 y 1:27,13 (concentración final de HSA de 10 mg/ml y de AX biotinilada comprendida entre  $1,6 \times 10^{-4}$  y 2,5 mg/ml). Alícuotas de 2 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con estreptavidina-HRP y detección por ECL.

b) Detección inmunológica de AX biotinilada mediante Western blot con anticuerpos monoclonales anti-AX

Se comparó la capacidad del anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 para detectar mediante Western blot aductos de HSA modificada por AX biotinilada con respecto a su capacidad de reconocimiento de aductos de HSA modificada por AX. En este ensayo se generaron *in vitro* aductos de HSA con AX y AX biotinilada en condiciones de pH básico que se analizaron por SDS-PAGE y Western blot usando para su detección el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 y estreptavidina conjugada con peroxidasa. Con el anticuerpo monoclonal AO3.2, que reconoce la cadena lateral de la AX, no se detectó la modificación de la proteína por AX biotinilada pero sí se pudo detectar la modificación por AX como se mostró en apartados anteriores; de este modo la modificación de la HSA por AX biotinilada sólo podía ser detectada mediante Western blot a partir de la incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa que reconocía de forma selectiva la biotina unida al grupo amino de la cadena lateral de la AX (Figura 57).



**Figura 57: Detección de HSA modificada por AX y AX biotinilada mediante Western blot.** HSA preparada en bicarbonato sódico 0,1 M se incubó durante 16 horas a 37°C en presencia de AX y AX biotinilada preparadas en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) en una relación molar HSA:fármaco 1:9 (concentración final de HSA de 10 mg/ml, de AX de 0,5 mg/ml y de AX biotinilada de 0,84 mg/ml). Alícuotas de 2 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot y detección por ECL. **A:** Detección de aductos HSA-AX y HSA-AX biotinilada mediante Western blot con estreptavidina-HRP **B:** Detección de aductos HSA-AX y HSA-AX biotinilada mediante Western blot con el anticuerpo primario anti-AX AO3.2 y un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón-HRP. En la parte inferior de ambas figuras se indica el tiempo de exposición de las películas de autorradiografía para la detección de los aductos.

#### 4.2.2. Reconocimiento de AX biotinilada por anticuerpos IgE específicos de pacientes con una reacción alérgica inmediata a AX

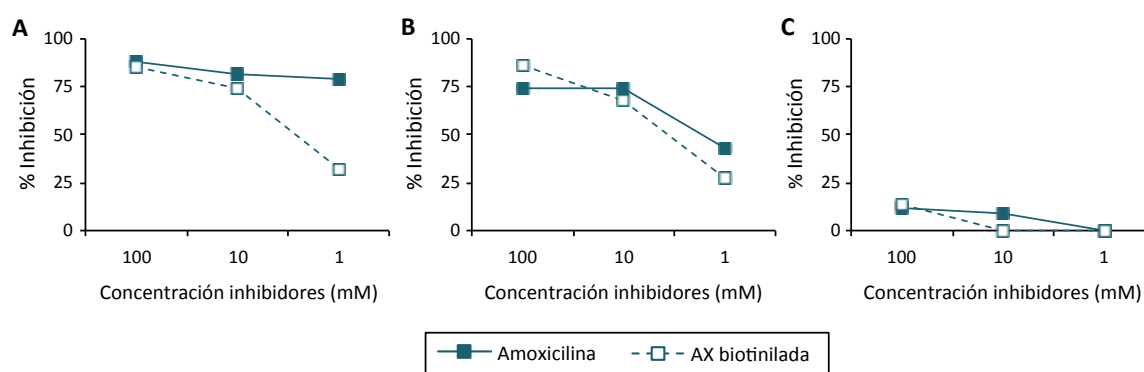
Tras comprobar que la AX biotinilada no era reconocida mediante Western blot por el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 se decidió analizar cómo era reconocida por los anticuerpos IgE específicos de pacientes diagnosticados de haber sufrido una reacción alérgica inmediata a AX. Para ello se realizó un ensayo de inhibición del RAST con sueros de pacientes alérgicos a AX con un porcentaje de RAST a AXO-PLL superior al 7% y de controles sanos no alérgicos, empleando como fase sólida discos de celulosa conjugados con AXO-PLL y como inhibidores AX y AX biotinilada a varias concentraciones.

Se observó que la IgE específica frente a AX de pacientes alérgicos selectivos a AX, con un porcentaje de RAST negativo para BPO-PLL y positivo para AXO-PLL, reconocía peor la AX biotinilada que la AX (Figura 58A). Este efecto estaría asociado a que los anticuerpos IgE anti-AX de estos pacientes reconocen la cadena lateral de

la AX, y la unión de la biotina al grupo amino de la cadena lateral de la AX podría interferir en su reconocimiento por estos anticuerpos, lo que coincidiría con los resultados observados en los ensayos de Western blot (Figura 57).

Sin embargo en pacientes alérgicos con reactividad cruzada entre penicilinas, con un porcentaje de RAST positivo a BPO-PLL y AXO-PLL, el reconocimiento de la AX y de la AX biotinilada fue similar posiblemente debido a que los anticuerpos IgE específicos de estos pacientes están dirigidos frente a la región nuclear de las penicilinas (Figura 58B).

También se comprobó que la AX biotinilada no era reconocida de forma inespecífica por sueros de controles sanos no alérgicos (Figura 58C).



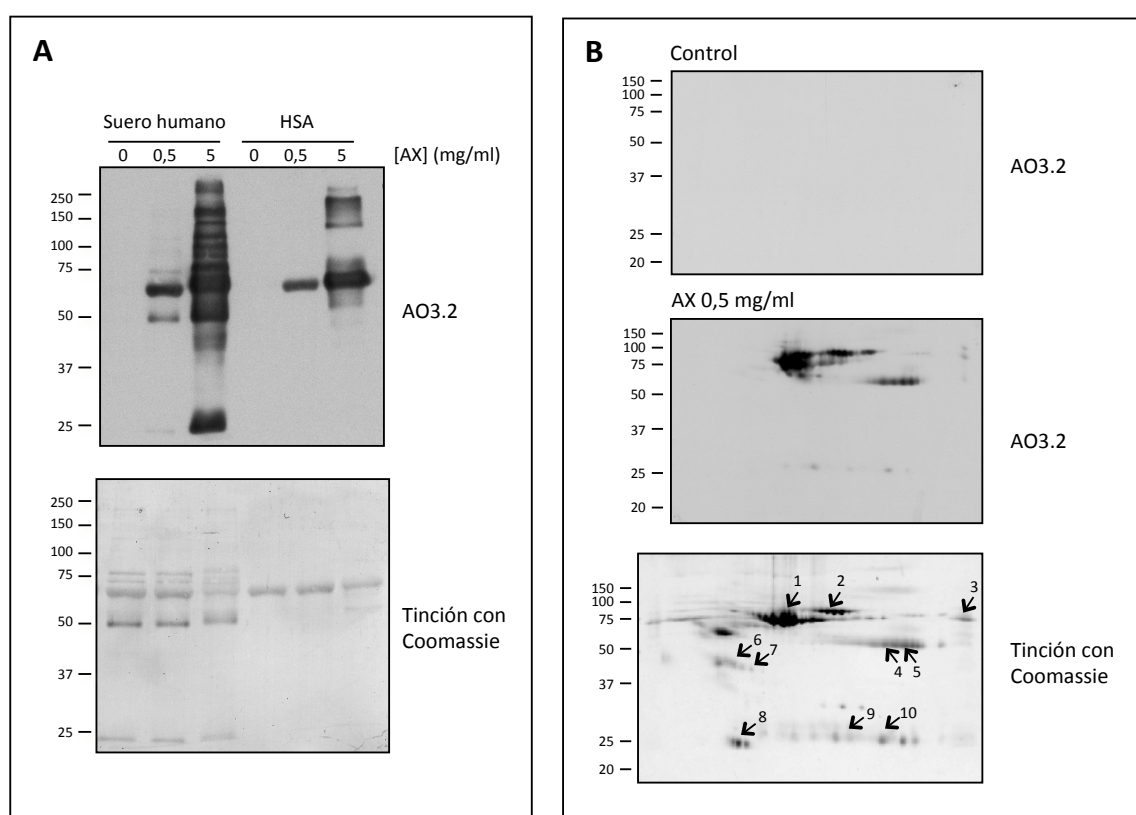
**Figura 58: Ensayo de inhibición del RAST realizado en pacientes que han sufrido una reacción alérgica inmediata a AX.** Se usó como fase sólida discos de celulosa conjugados a AXO-PLL y como inhibidores AX o AX biotinilada a 1, 10 y 100 mM en PBS. **A:** Resultados de la inhibición del RAST en un paciente alérgico selectivo a AX. **B:** Resultados de la inhibición del RAST en un paciente alérgico con reactividad cruzada entre penicilinas. **C:** Resultados de la inhibición del RAST en un control sano no alérgico.

## 5. Identificación de dianas séricas de la AX

### 5.1. Detección e identificación de proteínas diana de la AX en suero humano

La HSA es la proteína más abundante en el plasma humano y tiene una extraordinaria capacidad de unión a diferentes ligandos (Fasano *et al.*, 2005), por ello está considerada como la principal diana de la haptización por antibióticos BLs. Sin embargo, otras proteínas plasmáticas podrían modificarse covalentemente por AX en una proporción significativa y por tanto podrían ser buenas candidatas para mediar en las reacciones inmunológicas frente a estos antibióticos.

Para evaluar esta posibilidad se incubó suero humano con AX en condiciones de pH básico y se analizaron los aductos resultantes mediante SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2. Se observaron múltiples bandas positivas, incluso con las concentraciones más bajas de AX empleadas (Figura 59A), y con el fin de conocer la naturaleza de estas proteínas modificadas se realizó una electroforesis bidimensional de las muestras de suero seguida de un ensayo de huella peptídica mediante digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF MS. La identificación de las proteínas modificadas se confirmó por análisis de MALDI-TOF-TOF MS/MS de péptidos seleccionados para cada proteína (Figura 59B, Tabla 20).



**Figura 59: Detección inmunológica e identificación de proteínas séricas modificadas por AX mediante Western blot y MALDI-TOF-TOF MS/MS.** Se incubó suero humano o HSA durante 16 horas a 37°C con AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) a 0,5 y 5 mg/ml. **A:** Detección de aductos de proteínas séricas o HSA con AX analizando alícuotas de 2 µg de proteína por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y detección por ECL. En la parte inferior se muestra la tinción de proteína total de la membrana transferida con Coomassie. **B:** Detección de aductos de proteínas séricas con AX analizando por duplicado una alícuota de 100 µg de proteína mediante electroforesis bidimensional. Tras la electroforesis uno de los geles se usó para la detección de proteínas modificadas por AX mediante Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y el otro gel se usó para la detección de proteínas totales mediante tinción con

Coomassie. Los “spots” de interés se escindieron del gel teñido, se tripsinizaron y se identificaron mediante análisis de huella peptídica. Los resultados son representativos de varios ensayos en los que se obtuvieron resultados similares.

Las proteínas séricas modificadas por AX identificadas en este ensayo fueron la HSA, varias formas de la transferrina y las cadenas pesadas y ligeras de las Igs, sin embargo otras proteínas abundantes en el plasma como la apolipoproteína o la haptoglobina no se modificaron en nuestras condiciones experimentales (Tabla 20). Hay que destacar que de acuerdo con la señal obtenida en el Western blot estimamos que la modificación relativa de la transferrina en estas condiciones fue mayor que la de HSA, lo que sugiere que ésta u otras proteínas séricas podrían jugar un papel importante en las reacciones inducidas por AX. Tiene un interés particular la modificación de las Igs, ya que podría tener consecuencias funcionales relacionadas con la respuesta inmunológica y con la interpretación de los resultados de algunos inmunoensayos.

**Tabla 20:** Identificación de proteínas séricas modificadas por AX mediante análisis de huella peptídica por espectrometría de masas.

Nº spot <sup>a</sup>	Nombre proteína	Código de acceso <sup>b</sup>	Puntuación total <sup>c</sup>	Puntuación de iones <sup>d</sup>	Peso molecular (Da) <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	Péptidos coincidentes <sup>g</sup>	Cobertura (%) <sup>h</sup>	Identificación TOF/TOF <sup>i</sup>	Señal con AO3.2 <sup>j</sup>
1	Albúmina sérica humana	gi 168988718	570	41, 19, 91, 84, 81	67690	5,63	21	37	Sí	+
2	Apo-transferrina sérica humana (cadena A)	gi 110590599	524	55, 93, 84	76988	6,85	22	42	Sí	+
3	Albúmina sérica humana	gi 168988718	363	36, 79	67690	5,63	19	39	Sí	+
4	Cadena pesada inmunoglobulina G	gi 185362	115	52	52687	8,60	4	13	Sí	+
5	Cadena pesada inmunoglobulina G	gi 185363	150	52, 19	52687	8,60	5	16	Sí	+
6	Haptoglobina 2	gi 47124562	280	18, 28, 58, 61	31647	8,48	7	26	Sí	-
7	Haptoglobina 2	gi 47124562	270	18, 28, 58, 61	31647	8,48	7	26	Sí	-
8	Apolipoproteína A1	gi 90108664	121	24, 42	28061	5,27	4	16	Sí	-
9	Cadena ligera kappa4 inmunoglobulina	gi 170684480	187	94	24507	6,10	5	35	Sí	+
10	Cadena ligera kappa4 inmunoglobulina	gi 170684480	313	94, 80, 60	24507	6,00	5	48	Sí	+

<sup>a</sup> Nº de “spot” del gel de electroforesis bidimensional teñido con Coomassie (Figura 59B)

<sup>b</sup> Código de acceso de la proteína en la base de datos del NCBI

<sup>c</sup> Puntuación de probabilidad total de Mascot

<sup>d</sup> Puntuación de probabilidad de iones de Mascot

<sup>e</sup> Peso molecular teórico (Da)

<sup>f</sup> pl teórico<sup>g</sup> Nº de péptidos coincidentes<sup>h</sup> Cobertura de la secuencia proteica del candidato más probable propuesto por Mascot<sup>i</sup> Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF<sup>j</sup> Resultados del análisis por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2

## **5.2. Detección inmunológica de la modificación de proteínas séricas por AX en presencia de agentes oxidantes**

Se sabe que la HSA ejerce una actividad antioxidante en el plasma (Bishop *et al.*, 1985; Halliwell, 1988; Dean *et al.*, 1991; Bourdon *et al.*, 1999; Iglesias *et al.*, 1999) donde está expuesta a una situación de estrés oxidativo continuo (Bourdon *et al.*, 1999) y quizás constituya el principal y más abundante agente antioxidante circulante en el plasma, de hecho la HSA es la principal fuente extracelular de grupos sulfhidrilo reducidos que actúan como secuestradores de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

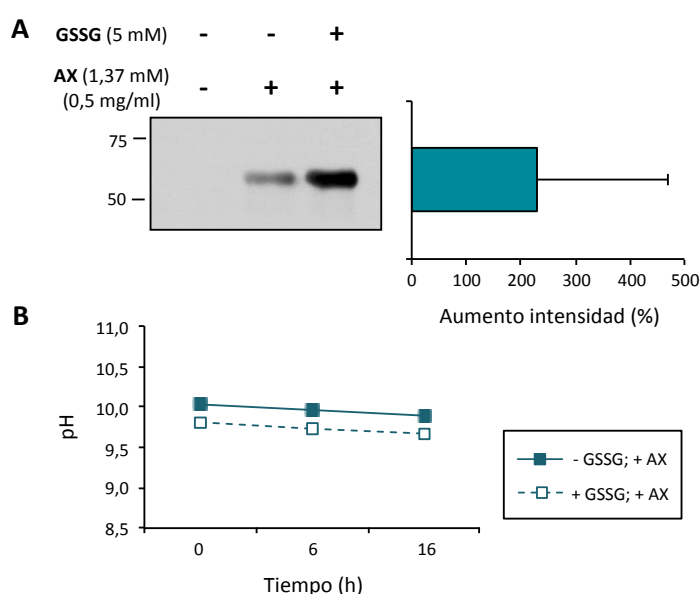
El estado redox de la HSA es importante para la unión covalente de fármacos y otros ligandos a la proteína, por ejemplo se ha comprobado que en la HSA oxidada las propiedades de unión a ligandos de los sitios de unión a ácidos grasos FA3-FA4 en el subdominio IIIA y la actividad esterasa disminuyen, probablemente debido a cambios conformacionales en este subdominio (Anraku *et al.*, 2001). Debido a la relevancia que tiene el estado redox de la HSA en la unión de determinados ligandos a la proteína se analizó el efecto que algún agente oxidante podría tener en la modificación de las proteínas séricas por la AX.

### **5.2.1. Efecto del GSSG sobre la modificación *in vitro* de HSA por AX**

La pareja glutatión reducido:glutatión oxidado (GSH:GSSG) es el sistema tampón intracelular más importante contra el estrés oxidativo (Navarro *et al.*, 1999; Lusini *et al.*, 2001) y puede usarse como biomarcador de este tipo de situaciones. Se han descrito perturbaciones en este sistema y alteraciones del estado redox asociadas a diferentes patologías, como enfermedades inflamatorias crónicas, distintos tipos de cáncer (Jaruga *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1999; Lusini *et al.*, 2001) y diabetes (West, 2000). Puesto que la administración de antibióticos se realiza durante procesos infecciosos, que son situaciones que se acompañan generalmente de inflamación y de estrés oxidativo, hemos explorado si la presencia de la forma oxidada del glutatión (GSSG) puede influir en el grado de modificación de las proteínas séricas por la AX.

Se diseñó un sistema modelo para comenzar a estudiar el posible efecto del estrés oxidativo en la modificación de proteínas por fármacos. En este sistema no se reflejaban exactamente las condiciones fisiológicas en las que se produce la modificación de proteínas séricas cuando se administra un antibiótico, sino que se trataba de un experimento *in vitro* en el que se emplearon las condiciones óptimas para conseguir la detección de posibles variaciones en los aductos generados. Se realizó un tratamiento previo de la HSA con GSSG a 5 mM antes de la incubación con AX y tras el análisis de los aductos obtenidos mediante SDS-PAGE y Western blot se observó un incremento en la modificación de la HSA por AX con respecto a un control de HSA modificada por AX pero sin tratar previamente con GSSG y se pudo determinar que el aumento medio de la intensidad de la señal inmunoreactiva detectada con respecto al control sin tratar con GSSG fue del 231,17% (Figura 60A).

Puesto que las variaciones de pH pueden influir en la formación de aductos, favoreciendo la hapténización de proteínas en condiciones de pH básico, se midió el pH de las muestras a lo largo de la reacción para comprobar que la incubación previa con GSSG no alteraba los valores del pH. Se pudo observar que los valores de pH se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de toda la reacción, por lo que el incremento observado en el grado de modificación de la HSA por AX no fue provocado por las condiciones de pH sino que se podía asociar a la acción del GSSG (Figura 60B).

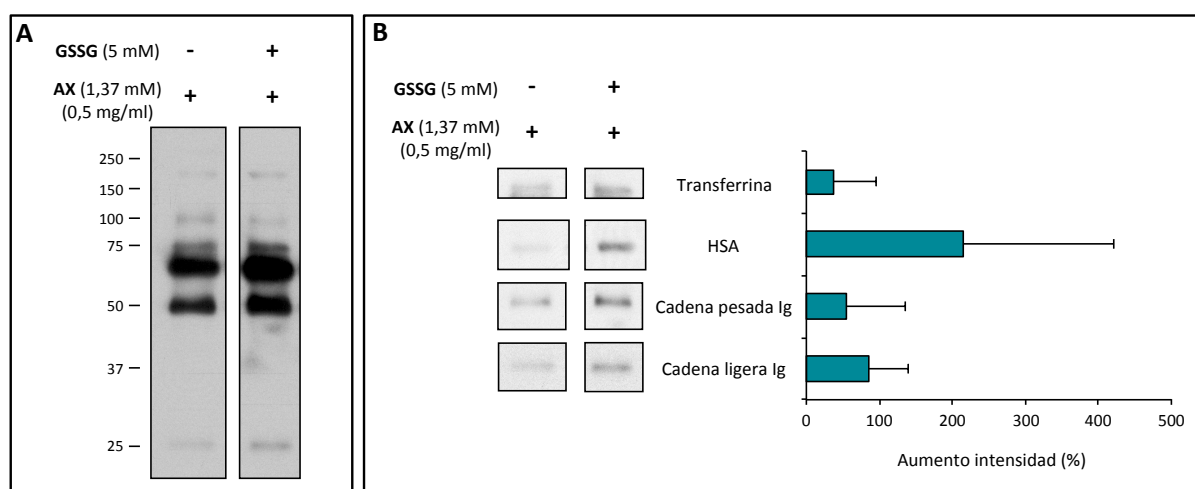


**Figura 60: Análisis del efecto del GSSG en la modificación de HSA por AX.** Se incubó durante 6 horas a 37°C HSA con GSSG a una concentración final de 0,3 mM (20 mg/ml) y 5 mM (3,1 mg/ml) respectivamente. Tras este tratamiento previo la HSA se incubó durante 16

horas a 37°C con AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) en una relación molar 1:9 (concentración final de HSA y AX de 10 y 0,5 mg/ml respectivamente). **A:** Detección inmunológica mediante Western blot de los aductos resultantes. Alícuotas de 2 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y detección por ECL. En la gráfica de la derecha se muestra el aumento (%) de la intensidad de la señal inmunorreactiva obtenida mediante Western blot en las muestras de HSA modificada por AX con un tratamiento previo con GSSG con respecto al control sin tratar con GSSG, expresado como la media  $\pm$  la DE de 4 ensayos en los que se obtuvieron resultados similares. **B:** Medida de los valores de pH durante el tratamiento con GSSG y AX.

### 5.2.2. Efecto del GSSG sobre la modificación *in vitro* de proteínas séricas por AX

Después de observar un incremento en la modificación de la HSA por AX tras su incubación previa con GSSG, comprobamos si el tratamiento con GSSG también afectaba a la modificación de otras proteínas séricas. Siguiendo las mismas condiciones experimentales que en el apartado anterior, se realizó un tratamiento previo de suero humano con GSSG a 5 mM y a continuación se realizó la modificación *in vitro* con AX. Tras analizar los aductos obtenidos mediante SDS-PAGE y Western blot, se pudo observar un incremento en la modificación por AX en las bandas correspondientes a la transferrina, HSA y cadenas pesadas y ligeras de las Igs (Figura 61A) y al cuantificar la intensidad de las señales inmunorreactivas se comprobó que el aumento medio de intensidad (%) con respecto a un control sin tratar con GSSG más elevado correspondía a la HSA (214,65%) y el más bajo a la transferrina (38,20%) (Figura 61B).



**Figura 61: Análisis del efecto del GSSG en la modificación de proteínas séricas por AX.** Se incubó suero humano durante 6 horas a 37°C con GSSG a 5 mM en PBS y tras este tratamiento previo el suero se incubó durante 16 horas a 37°C con AX a 0,5 mg/ml (1,37



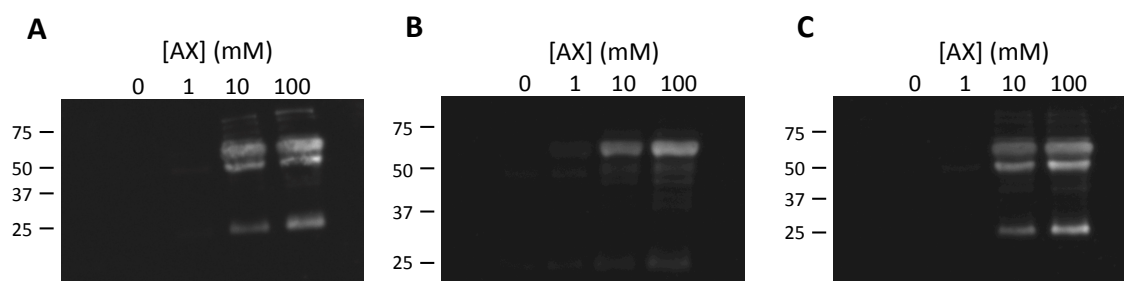
mM) preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2). **A:** Detección inmunológica mediante Western blot de los aductos resultantes. Alícuotas de 2 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y detección por ECL. **B:** Comparación de la intensidad de la señal inmunorreactiva obtenida mediante Western blot con el anticuerpo AO3.2 entre las muestras tratadas y sin tratar previamente con GSSG para las cuatro proteínas séricas analizadas. En la gráfica de la derecha se muestra el aumento (%) de la intensidad de la señal inmunorreactiva obtenida con respecto al control sin tratar con GSSG expresado como la media  $\pm$  la DE de 5 ensayos en los que se obtuvieron resultados similares.

### 5.3. Modificación de proteínas séricas por AX en ensayos de inhibición del RAST

En los ensayos de inhibición del RAST descritos en apartados anteriores en los que se empleaba como inhibidor AX sin conjugar previamente a una estructura portadora, es posible que esta AX se uniera a alguna de las proteínas séricas durante el período de incubación con el suero y posiblemente los aductos generados fueron las estructuras reconocidas por los anticuerpos IgE específicos de los pacientes alérgicos a AX.

Con el fin de comprobar a qué proteínas séricas se unía la AX durante estos ensayos y si existían diferencias entre las proteínas modificadas en pacientes selectivos a AX, con reactividad cruzada entre penicilinas y controles sanos no alérgicos, se realizó un ensayo de inhibición del RAST en el que se recuperó el suero incubado con el inhibidor AX (incubación de 3 horas a temperatura ambiente) antes de añadir el anticuerpo anti-IgE marcado con  $I^{125}$ . Las muestras recuperadas se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y detección por ECL. El patrón de modificación de proteínas obtenido fue el mismo en las muestras de suero de pacientes selectivos, con reactividad cruzada y controles (Figura 62) y coincidía con el obtenido tras la modificación *in vitro* de suero humano con AX durante 16 horas a 37°C (Figura 59A). Por tanto hay que considerar que en los ensayos de inhibición del RAST la estructura reconocida por los anticuerpos IgE específicos de los pacientes alérgicos a AX no era necesariamente la molécula de AX aislada, sino que podría ser la AX unida a alguna(s) proteína(s) sérica(s) como portadora y aunque en algunos casos las proteínas modificadas durante el ensayo coincidieron con proteínas usadas en la generación *in vitro* de conjugados con la AX, el grado o el modo en que se modificaron pudo ser distinto provocando que se reconocieran de distinta manera, ya que la obtención de estos conjugados se realiza

siguiendo el método de generación de aductos para la inmunización de animales y la obtención de anticuerpos, es decir, se modifican en condiciones alcalinas que favorecen la hapténización de proteínas y en presencia de elevadas concentraciones del fármaco.



**Figura 62: Detección inmunológica mediante Western blot de la modificación por AX de proteínas séricas en ensayos de inhibición del RAST.** Se incubó suero humano durante 3 horas a temperatura ambiente con AX preparada a 1, 10 y 100 mM en PBS, a continuación se añadió la fase sólida conjugada a AXO-PLL con la que se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y finalmente se recuperó la fase fluida (suero + inhibidor) antes de añadir el anticuerpo anti-IgE marcado con  $I^{125}$ . Alícuotas de 2  $\mu$ g de proteína de las muestras recuperadas se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 y visualización de la señal inmunorreactiva en un sistema analizador de imagen. Ensayo realizado con suero de un paciente alérgico selectivo a AX (A), suero de un paciente alérgico con reactividad cruzada entre penicilinas (B) y suero de un control sano no alérgico (C).

## 6. Caracterización de la modificación *in vitro* de HSA por AX mediante espectrometría de masas

Como se ha mencionado anteriormente, se considera que la HSA es la principal proteína diana de la AX. Por esta razón se ha realizado una caracterización detallada de la interacción HSA-AX, determinando la estequiometría de la modificación HSA:AX de los aductos generados *in vitro* e identificando los principales sitios nucleofílicos de la HSA con capacidad de reaccionar covalentemente con el anillo BL de la AX.

Para realizar esta caracterización se optó en primer lugar por realizar el análisis de los aductos HSA-AX mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF, pero para lograr una mejor caracterización de los aductos y la identificación de los residuos a los que se une covalentemente la AX fue necesario un análisis posterior con un espectrómetro de masas de alta resolución LTQ Orbitrap XL que se realizó por el grupo de investigación del profesor Giancarlo Aldini del Departamento

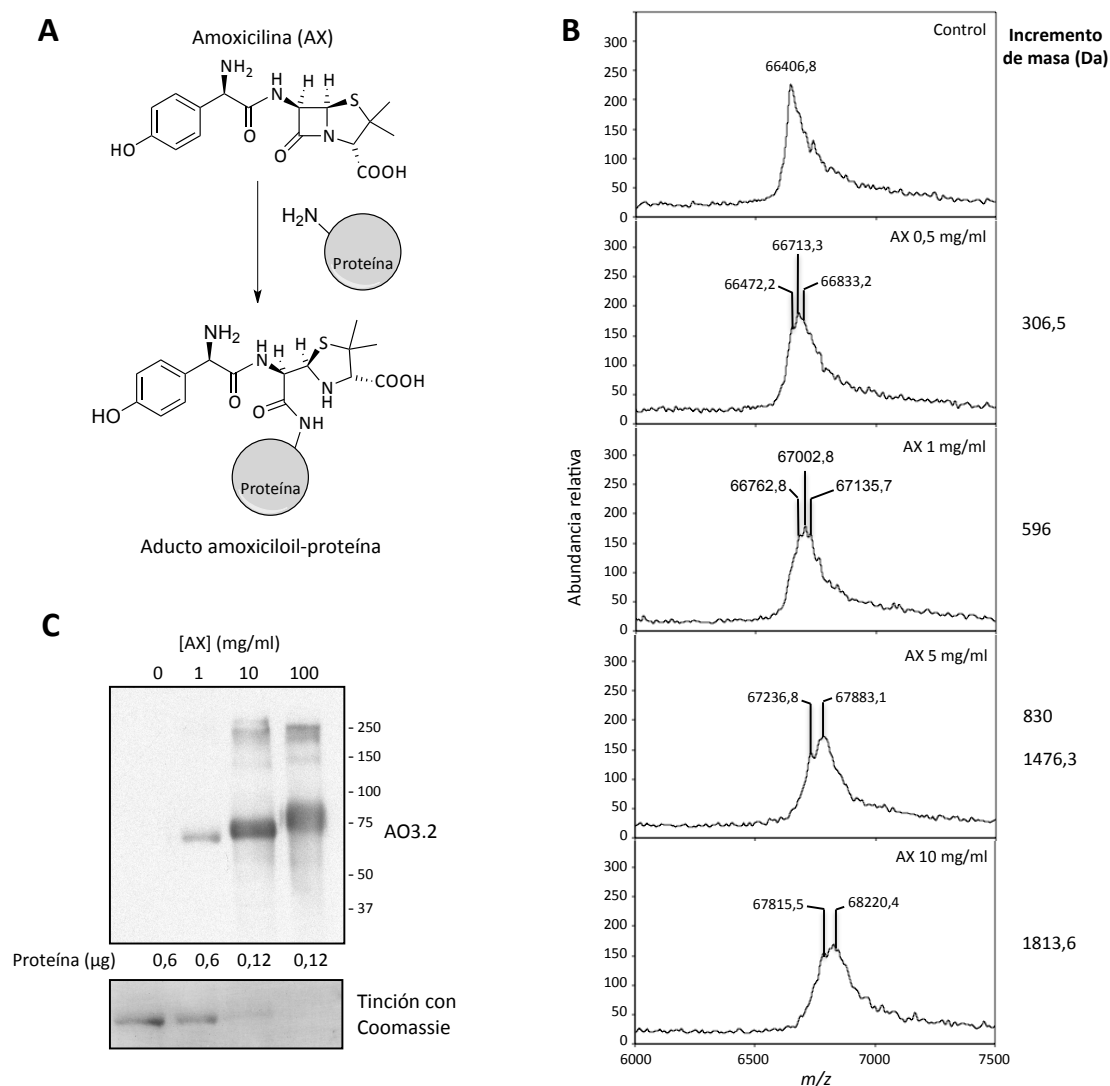
de Ciencias Farmacéuticas “Pietro Pratesi” de la “Università degli Studi di Milano” (Milán, Italia).

## **6.1. Caracterización de aductos HSA-AX generados *in vitro* mediante MALDI-TOF**

### **6.1.1. Detección de aductos HSA-AX y estimación de la estequiometría de la modificación**

En estos ensayos se emplearon aductos HSA-AX generados *in vitro* en condiciones de pH alcalino usando concentraciones de AX próximas a las usadas en la obtención de aductos HSA-AX para estudios inmunológicos o para la generación de anticuerpos (1-100 mg/ml) (Audicana *et al.*, 1994; Mayorga *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2011). Los aductos se analizaron por MALDI-TOF MS y los espectros mostraron un incremento en la masa de la HSA dependiente de la concentración de antibiótico empleada para su modificación (Figura 63). Se observó un desplazamiento del centroide del pico de HSA incluso a la concentración más baja de AX empleada (0,5 mg/ml), para la que se determinó un incremento de masa de la proteína de 306,5 Da con respecto al control, que podría corresponder con la incorporación de una molécula de AX. En el espectro de HSA tratada con 5 mg/ml de AX se pudieron observar 2 picos con un incremento de  $m/z$  con respecto al control de 830 Da y 1476 Da, compatible con la incorporación de 2 y 4 moléculas de AX respectivamente. Finalmente, el espectro de HSA tratada con 10 mg/ml de AX, condiciones que estaban próximas a las que se emplean de forma rutinaria en la obtención los aductos HSA-AX para aplicaciones inmunológicas, mostraron un pico principal con un valor de  $m/z$  de 68220,4 Da, representando un incremento de aproximadamente 1813,6 Da con respecto al control y que pudo ser debido a la incorporación de hasta 5 moléculas de AX y/o a la existencia de otras modificaciones en la molécula de HSA durante la incubación en presencia del antibiótico (Figura 63B).

Además, estos aductos se analizaron por SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2, y se observó un incremento en el peso molecular de la banda de la HSA correspondiente a la incorporación de varias moléculas de AX. También se observó la aparición de especies con un elevado peso molecular que sugería la formación de agregados de HSA durante la incubación con el antibiótico (Figura 63C).



**Figura 63: Detección de la interacción de la AX con la HSA mediante MALDI-TOF MS y Western blot.** **A:** Estructura de la AX y del aducto formado con una proteína (aducto amoxiciloil-proteína) a través de un residuo no específico. **B:** Análisis por MALDI-TOF MS de los aductos HSA-AX. HSA preparada en bicarbonato sódico 0,1 M se incubó durante 16 horas a 37°C con AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) en una relación molar HSA:AX de 1:9; 1:18; 1:90 y 1:180 (concentración final de HSA de 10 mg/ml y de AX de 0,5; 1; 5 y 10 mg/ml). Los aductos resultantes se analizaron por MALDI-TOF MS. El incremento de masa registrado con respecto a la proteína control se indica a la derecha. **C:** Detección inmunológica de HSA modificada por AX mediante Western blot. Los aductos HSA-AX se obtuvieron en las mismas condiciones que en el panel B y se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y detección por ECL. En cada calle del gel se cargaron cantidades decrecientes de proteína (indicadas en la parte inferior de la imagen) para evitar la saturación de la señal. En el panel inferior se muestra la tinción de proteína total con Coomassie de la membrana transferida. Los resultados son representativos de al menos 4 ensayos para los que se obtuvieron resultados similares.

### 6.1.2. Identificación de los sitios de modificación de la HSA por AX

Los aductos HSA-AX empleados en este ensayo se obtuvieron *in vitro* en condiciones de pH alcalino empleando AX a una concentración de 0,5 y 5 mg/ml. Después de comprobar mediante Western blot que se habían generado los aductos con AX se realizó la digestión con tripsina de las muestras y los péptidos resultantes de la tripsinización se analizaron por MALDI-TOF MS. Se emplearon varios procedimientos de digestión con el fin de conseguir un alto porcentaje de cobertura de la HSA (Tabla 21) y se obtuvo una cobertura máxima del 73% con la tripsinización en gel de la proteína. Sin embargo, mediante el análisis por MALDI-TOF MS no se pudieron detectar péptidos de HSA con un incremento de masa que coincidiera con el tamaño de una molécula de AX o un fragmento de la misma con respecto a la muestra control, además se pudo observar una disminución en el número de péptidos detectados en las muestras modificadas por el fármaco que podría deberse a que la proteína modificada por AX era menos susceptible a la digestión.

**Tabla 21:** Condiciones de tripsinización de la HSA y porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína obtenido por MALDI-TOF MS. Los aductos empleados en la tripsinización se obtuvieron *in vitro* a partir de HSA preparada en bicarbonato sódico 0,1 M que se incubó durante 16 horas a 37°C con AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) en una relación molar HSA:AX de 1:9 y 1:90 (concentración final de HSA de 10 mg/ml y de AX de 0,5 y 5 mg/ml). También se tripsinizaron muestras control de HSA sin modificar por AX.

Tipo	Tratamiento previo HSA	Secado muestra <sup>a</sup>	Tripsina <sup>b</sup>	Tripsina:HSA	Duración tripsinización	Espectrómetro de masas	% Cobert <sup>c</sup>
En solución	NO	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:25	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	13%
En solución	NO	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:50	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	13%
En solución	TFE (50%)	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:10	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	25,3%
En solución	TFE (50%) (añadir sobre muestra de proteína seca en centrifuga de vacío)	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:10	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	34,4%
En solución	DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	NO	En TFA 0,01% (Boehringer)	1:20	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	25,5%
En solución	DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	NO	En HCl 1 mM (Promega)	1:20	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	26,8%
En solución	TFE (50%), DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	NO	En HCl 1 mM (Promega)	1:10	o/n a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	39,3%
En gel	NO	NO	En bicarbonato amónico 50 mM (Promega)	375 ng tripsina/spot	8 h a 37°C	MALDI-TOF-TOF Autoflex III	69%
En solución	DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	SI	En bicarbonato amónico 25 mM (Promega)	1:20	o/n a 37°C	4800 MALDI-TOF-TOF	60%

Tipo	Tratamiento previo HSA	Secado muestra <sup>a</sup>	Tripsina <sup>b</sup>	Tripsina:HSA	Duración tripsinización	Espectrómetro de masas	% Cobert <sup>c</sup>
En gel	DTT (10 mM), iodoacetamida (50 mM)	SI	En bicarbonato amónico 25 mM 50% acetonitrilo (Promega)	450 ng tripsina/spot	45 min a 4°C 4 h a 37°C	4800 MALDI- TOF-TOF	73%

<sup>a</sup> Secado muestra previo a la tripsinización en centrífuga de vacío

<sup>b</sup> Preparación tripsina y casa comercial

<sup>c</sup> Porcentaje cobertura de la secuencia de la proteína.

## 6.2. Caracterización de aductos HSA-AX generados *in vitro* mediante LTQ Orbitrap XL

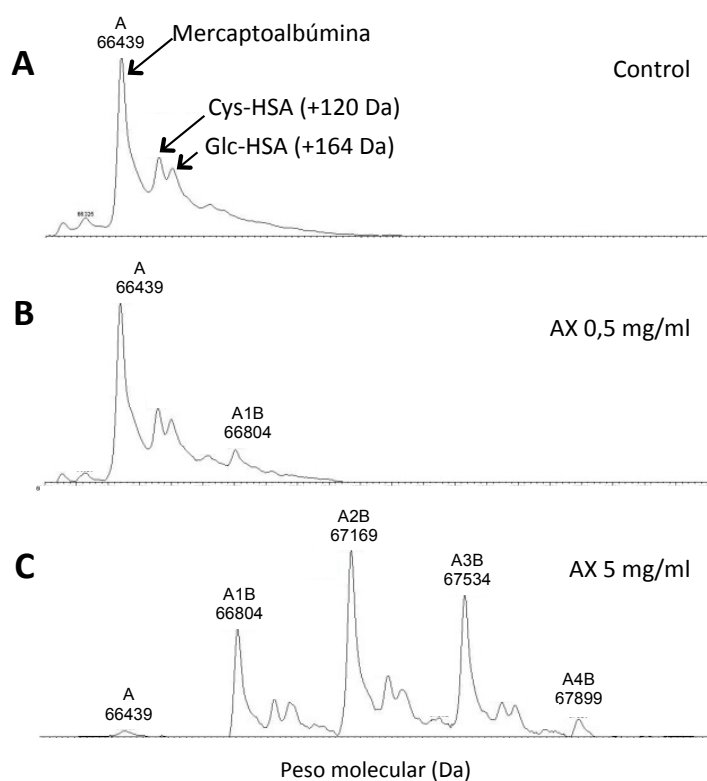
### 6.2.1. Detección de aductos HSA-AX y estimación de la estequiometría de la modificación

La capacidad de la AX para reaccionar covalentemente con la HSA y la estequiometría de la reacción se evaluó en primer lugar mediante la infusión directa en el espectrómetro de masas de aductos HSA-AX generados *in vitro* en condiciones de pH neutro empleando una relación molar HSA:AX de 1:9 y 1:90 y muestras control de HSA sin modificar.

El espectro de ESI-MS deconvolucionado obtenido para las muestras de HSA sin modificar por AX, se caracterizó por un pico principal de 66439 Da correspondiente a la mercaptoalbúmina y dos picos menores de 66559 Da (+120 Da) y 66603 Da (+164 Da) que se atribuyeron a las formas cisteiniladas y glicadas de la HSA respectivamente (Figura 64A), como ya ha sido descrito (Aldini *et al.*, 2006). El espectro de ESI-MS deconvolucionado de la HSA incubada en condiciones de pH neutro con AX en una relación molar HSA:AX de 1:9 mostró la generación de un único aducto de 66804 Da, desplazado 365 Da con respecto a la mercaptoalbúmina que correspondía con el determinante AXO (Figura 64B) y que representaba el 20% de la proteína nativa. Al aumentar la concentración de la AX (HSA:AX 1:90) la abundancia relativa de las isoformas nativas de la HSA se redujo drásticamente y aparecieron tres aductos principales de la HSA a 66804, 67169 y 67534 Da, desplazados por 365, 730 y 1095 Da respectivamente con respecto a la mercaptoalbúmina nativa, y que se podían atribuir a la existencia de aductos HSA-AXO con la siguiente estequiometría: 1:1, 1:2, 1:3 (Figura 64C). También se observó que las formas cisteiniladas y glicadas de la HSA se modificaban de un modo similar al de la mercaptoalbúmina, lo que indicaba que la Cys 34 (sitio de cisteinilación) y la

Lys 525 (principal sitio de glicación) no estaban involucradas en la reacción con la AX en estas condiciones experimentales.

Hay que mencionar que se realizaron lavados de todas las muestras con una mezcla de etanol:H<sub>2</sub>O antes del análisis de ESI-MS hasta que la abundancia relativa de los aductos se mantuvo constante. Este procedimiento se realizó para eliminar los complejos no covalentes AX-proteína que pudieran quedar en la fase gaseosa, aunque la muestra se pulverizaba bajo condiciones desnaturalizantes. De hecho, cuando la HSA se incubó con AX en una relación molar HSA:AX de 1:9 y se inyectó tras un lavado realizado sólo con H<sub>2</sub>O, además del monoadducto de 66804 Da se observaron otros aductos con una proporción estequiométrica HSA:AX de 1:2 y 1:3 debido a la presencia de interacciones no covalentes que desaparecieron después de sucesivos lavados con la mezcla de etanol:H<sub>2</sub>O.



**Figura 64: Caracterización de la HSA modificada por AX mediante ESI-MS.** Espectro de MS deconvolucionado obtenido a partir de experimentos de infusión directa de HSA incubada durante 18 horas a 37°C con AX en PBS en una relación molar HSA:AX de 1:9 y 1:90 (concentración final de HSA de 10 mg/ml y de AX de 0,5 y 5 mg/ml). La isoforma mercaptoalbúmina es el pico de 66438 Da (pico A) y los picos A1B, A2B, A3B y A4B corresponden a los aductos HSA:AX con la siguiente estequiometría: 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4.

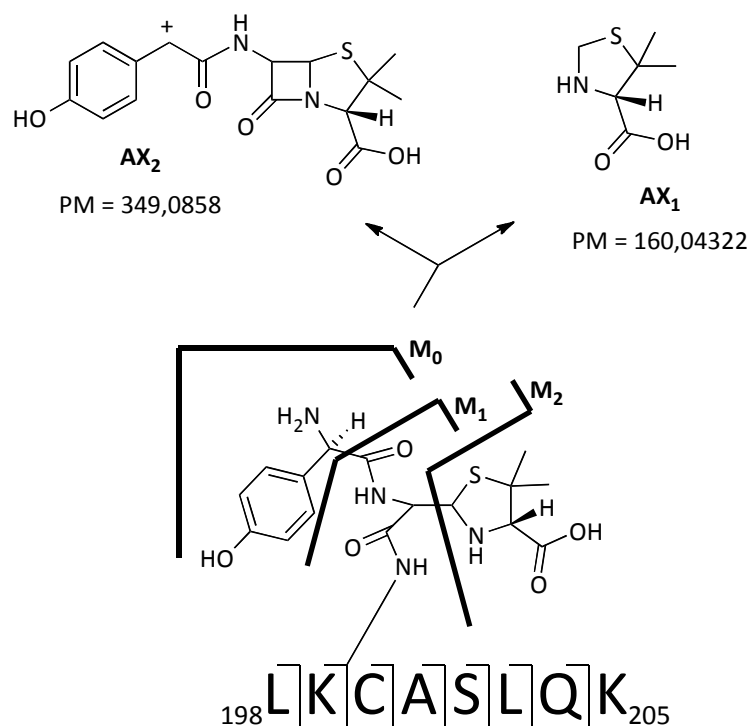
### **6.2.2. Identificación de los sitios de modificación de la HSA por AX en muestras de HSA purificada**

La identificación de los sitios de la HSA modificados por AX se realizó mediante análisis por LC-ESI-MS de la mezcla de péptidos resultantes de la digestión de la proteína con tripsina y tripsina junto a quimotripsina. La cobertura de la proteína nativa y modificada por AX fue siempre superior al 90% y 85% para las digestiones con tripsina y tripsina junto con quimotripsina respectivamente. Se debe mencionar que los residuos de lisina más reactivos recogidos en la literatura y determinados por estudios de modelización molecular estaban cubiertos en las digestiones.

La primera aproximación para identificar los péptidos modificados por AX y los correspondientes sitios de modificación se basaron en la búsqueda algorítmica Sequest introduciendo la modificación por el grupo AXO (+365 Da) como una modificación variable sobre los residuos de Lys, His, Cys y Ser, pero finalmente este abordaje no resultó adecuado para la identificación de los péptidos modificados por AX.

Se consiguió optimizar el análisis mediante ESI-MS analizando el proceso de fragmentación de péptidos sintéticos de la HSA que contenían un residuo nucleofílico de lisina (Lys 199), ya que previamente se había comprobado que la lisina era el residuo de la HSA más reactivo para la AX con respecto a otros residuos nucleofílicos como la histidina y la cisteína (Ariza *et al.*, 2012). Se observó que el espectro de MS/MS de los aductos AX-Lys detectado con el modo de fragmentación de iones HCD se caracterizaba por la detección de fragmentos de iones unidos a AX fragmentada con la pérdida del grupo 4-hidroxibencilamina ( $M_1$ ) o del anillo de tiazolidina ( $M_2$ ) y por la detección de fragmentos de la molécula de AX generados por la escisión del anillo de tiazolidina ( $AX_1$ ,  $m/z = 160$  Da) y por la pérdida del grupo amino de su cadena lateral ( $AX_2$ ,  $m/z = 349,08$  Da) (Figura 65). A partir de estos fragmentos específicos se pudo generar una lista de iones precursores (Tabla 22) y se pudo observar que el método era altamente específico porque estos iones precursores no se detectaron en las muestras control.





**Figura 65:** Fragmentos de iones generados y detectados con el modo de fragmentación HCD del péptido sintético de HSA  $_{198}\text{LKCASLQK}_{205}$  modificado por AX. Se detectaron fragmentos de iones unidos a AX fragmentada (M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>) y fragmentos de la molécula de AX (AX<sub>1</sub> y AX<sub>2</sub>).

Se identificaron 8 iones precursores que coincidían con los obtenidos en una lista teórica de iones haptenizados, correspondientes a 6 péptidos haptenizados diferentes, para los que se determinó su secuencia de aminoácidos y se identificó el residuo donde se localizaba la modificación por el fármaco mediante el análisis del espectro de MS/MS. Se identificaron los residuos Lys 190, 199 y 541 como sitios de modificación de la HSA por AX cuando se empleaba una relación molar HSA:AX de 1:9, y al aumentar la concentración de AX hasta una relación molar HSA:AX de 1:90 se detectaron 6 sitios de modificación que correspondían con las Lys 190, 199, 351, 432, 541 y 545 (Tabla 22).

**Tabla 22:** Péptidos de HSA modificados por AX detectados mediante LC-ESI-MS e identificación de residuos modificados mediante LC-ESI-MS-MS.

Péptidos <sup>a</sup>	Ión precursor (m/z)	Carga (Z)	Iones haptenizados teóricos	Precisión (ppm)	Secuencia	Sitio de modificación	HSA:AX 1:9	HSA:AX 1:90
P1	628,63147	3	628,63163	0,25	$_{182}\text{LDEL RDEGK}_{195}\text{#ASSAK}_{195}$	Lys 190	Sí	Sí
	471,72574	4	471,72554	0,4	$_{182}\text{LDEL RDEGK}_{195}\text{#ASSAK}_{195}$	Lys 190	Sí	Sí
P2	528,74624	2	528,74626	0,04	$_{198}\text{LK}\text{#C*ASL}_{203}$	Lys 199	Sí	Sí

Péptidos <sup>a</sup>	Ión precursor (m/z)	Carga (Z)	Iones haptenizados teóricos	Precisión (ppm)	Secuencia	Sitio de modificación	HSA:AX 1:9	HSA:AX 1:90
P3	480,72837	2	480,72839	0,04	<sup>349</sup> LAK#TY <sub>353</sub>	Lys 351	No	Sí
P4	584,29468	2	584,29496	0,48	<sup>429</sup> NLGK#VGSK <sub>436</sub>	Lys432	No	Sí
P5	591,79474	2	591,79481	0,12	<sup>539</sup> ATK#EQLK <sub>545</sub>	Lys 541	Sí	Sí
	394,86562	3	394,86563	0,02	<sup>539</sup> ATK#EQLK <sub>545</sub>	Lys 541	Sí	Sí
P6	780,83907	2	780,83891	-0,20	<sup>542</sup> EQLK#AVMDDF <sub>551</sub>	Lys 545	No	Si

Los aductos HSA-AX empleados en el ensayo se obtuvieron por incubación de HSA con AX durante 18 horas a 37°C en PBS en una relación molar HSA:AX de 1:9 y 1:90 (concentración final de AX de 0,5 y 5 mg/ml) y los aductos resultantes se sometieron a digestión con tripsina y quimotripsina.

<sup>a</sup> Péptidos haptenizados detectados por LC-ESI-MS

#: aducto amoxiciloil

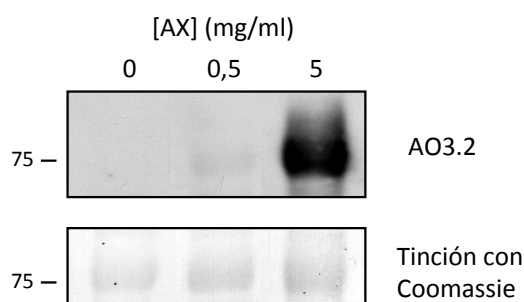
\*: carboimidometil-cisteína

### 6.2.3. Identificación de los sitios de modificación de la HSA presente en suero humano por AX

Se estudió si al modificar con AX la HSA presente en suero humano en lugar de HSA purificada los sitios de modificación de esta proteína eran los mismos o si existían algunas diferencias provocadas por la influencia del resto de componentes séricos y/o las características físico-químicas del suero. Además este ensayo se aproximaría más a las condiciones de haptenización *in vivo*. Se generaron aductos de HSA-AX incubando suero humano con AX en condiciones de pH neutro y alcalino y a continuación se purificó la HSA por columnas de afinidad siguiendo el procedimiento descrito en el material y métodos. Los aductos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 (Figura 66) y se comprobó que la señal inmunorreactiva se detectaba con una sensibilidad similar a la de los ensayos de modificación de HSA purificada, lo que podría indicar que no existían cambios drásticos en las características de la modificación de la HSA por AX en función de que la proteína estuviera purificada o junto con el resto de componentes séricos en los ensayos *in vitro*.

Al realizar el análisis mediante LC-ESI-MS y LC-ESI-MS-MS de los aductos generados en condiciones de pH neutro se confirmaron, en general, los sitios de

modificación identificados en los ensayos realizados con HSA purificada con algunas diferencias. Concretamente, cuando el suero humano se incubó en presencia de 5 mg/ml de AX se identificaron como sitios de modificación los mismos residuos que en el apartado anterior (Lys 190, 199, 351, 432, 541 y 545), sin embargo a la concentración de AX de 0,5 mg/ml se identificaron los residuos Lys 190 y 432 en lugar de las Lys 190, 199 y 541 identificadas en la modificación de la HSA previamente purificada.



**Figura 66: Detección inmunológica de aductos HSA-AX obtenidos a partir de la modificación de suero humano con AX y la purificación posterior de la HSA modificada.** Se incubó suero humano con AX preparada en carbonato bicarbonato 50 mM (pH 10,2) a 0,5 y 5 mg/ml durante 16 horas a 37°C y a continuación se purificó la HSA por columnas de afinidad. Alícuotas de 2 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 y detección por ECL. En el panel inferior se muestra la tinción de proteína total con Coomassie de la membrana transferida. Los resultados son representativos de 3 ensayos en los que se obtuvieron resultados similares.

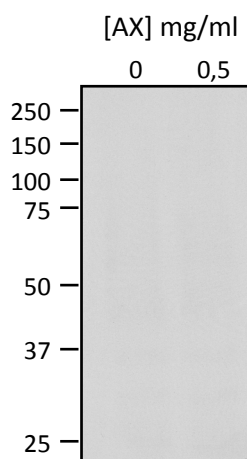
## 7. Identificación de dianas celulares de la AX

Es necesario analizar el papel que podrían desempeñar determinadas proteínas celulares como dianas de la AX en los procesos de hapténización. Se realizaron experimentos preliminares a partir del tratamiento con AX y AX biotinilada de una línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) para el posterior análisis de los aductos fármaco-proteína celular mediante técnicas proteómicas y microscopía de fluorescencia.

### 7.1. Detección inmunológica de proteínas celulares modificadas por AX mediante Western blot

En una primera aproximación se realizó el tratamiento de una línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) con AX durante 24 horas, eliminando el FBS y los antibióticos (penicilina y estreptomicina) del medio de cultivo 24 horas del

tratamiento. A partir de las células tratadas se obtuvieron lisados celulares que se analizaron por SDS-PAGE y Western blot empleando el anticuerpo anti-AX AO3.2. En estas condiciones experimentales no se pudo observar modificación de las proteínas celulares tratadas con respecto al control sin tratar (Figura 67), quizás debido a que se modificó una proporción muy baja de proteínas celulares con respecto al total de proteínas de los lisados obtenidos tras el tratamiento.



**Figura 67: Detección de proteínas de macrófagos de ratón modificadas por AX mediante Western blot.** Se realizó el tratamiento de una línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) durante 24 horas con AX a 0,5 mg/ml preparada en PBS. Tras el tratamiento se obtuvieron los lisados celulares con tampón de homogeneización y lisis mecánica, alícuotas con 15 µg de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con el anticuerpo anti-AX AO3.2 y detección por ECL.

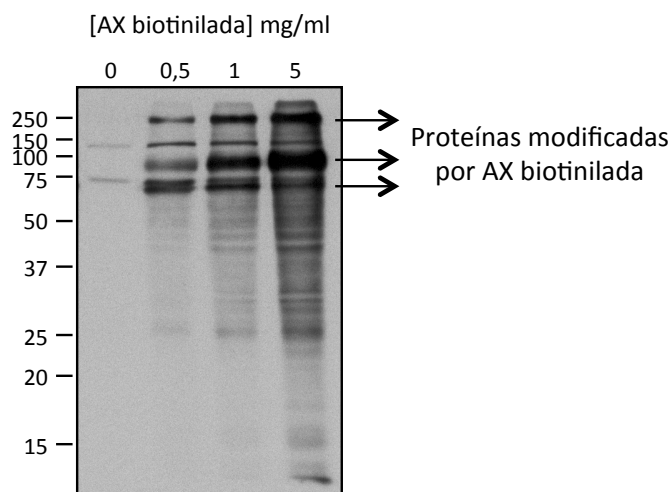
## **7.2. Detección, identificación y visualización de proteínas celulares modificadas por AX biotinilada**

### **7.2.1. Detección e identificación de proteínas celulares modificadas por AX biotinilada mediante Western blot y espectrometría de masas**

Con el fin de poder detectar posibles proteínas celulares diana de los procesos de haptenización se optó por tratar la línea celular de macrófagos con AX biotinilada ya que la sensibilidad de la detección con estreptavidina conjugada con peroxidasa es superior a la detección con el anticuerpo primario AO3.2 y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

Se realizó el tratamiento de los macrófagos con AX biotinilada en las mismas condiciones en las que se había realizado el tratamiento con AX y los lisados celulares obtenidos se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot empleando estreptavidina conjugada con peroxidasa. En la muestra control sin tratar con AX

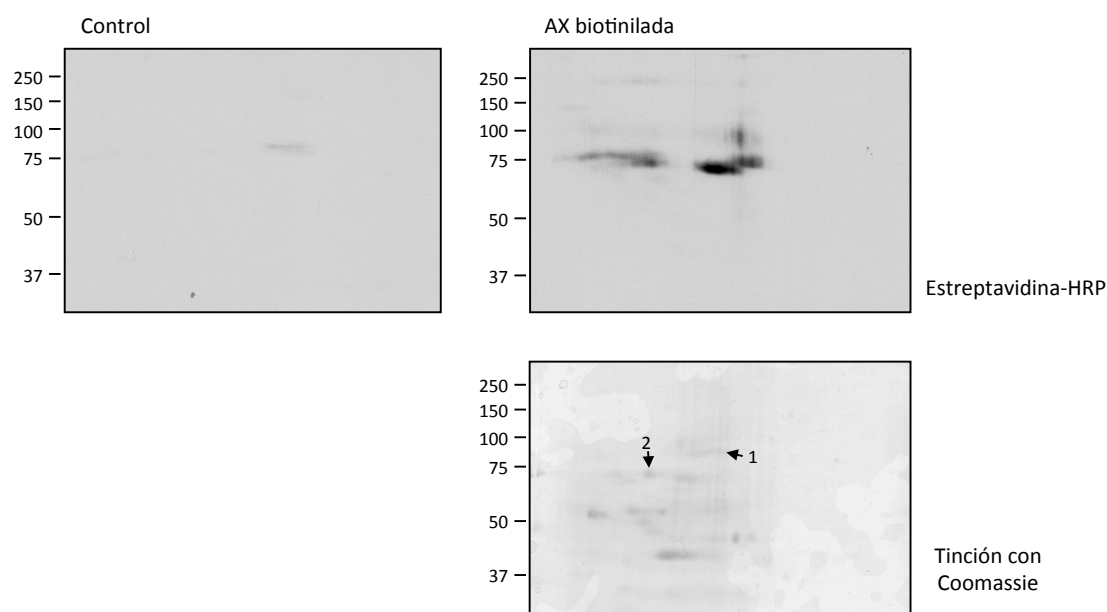
biotinilada se observaron 2 bandas que correspondían con proteínas biotiniladas endógenas de aproximadamente 75 y 130 kDa de peso molecular y que podrían tratarse de las proteínas biotiniladas propionil CoA carboxilasa (74 kDa) y piruvato carboxilasa (125 kDa), ambas proteínas mitocondriales. En las muestras tratadas con concentraciones crecientes de AX biotinilada se pudieron detectar, además de estas 2 proteínas biotiniladas endógenas, 3 polipéptidos modificados por la AX biotinilada que tenían un peso molecular aproximado de 70, 90 y 250 kDa (Figura 68).



**Figura 68: Detección de proteínas de macrófagos de ratón modificadas por AX biotinilada mediante Western blot.** Se realizó el tratamiento de una línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) durante 24 horas con AX biotinilada a 0,5; 1 y 5 mg/ml preparada en PBS. Tras el tratamiento se obtuvieron los lisados celulares con tampón de homogeneización y lisis mecánica, alícuotas con 15  $\mu$ g de proteína se analizaron por SDS-PAGE seguida de Western blot con estreptavidina-HRP y detección por ECL.

Posteriormente se emplearon los mismos lisados celulares de macrófagos para su análisis por electroforesis bidimensional y Western blot detectando las proteínas biotiniladas con estreptavidina conjugada con peroxidasa. En las muestras tratadas con AX biotinilada se detectaron varios “spots” positivos para la señal de biotina de pesos moleculares superiores a 65 kDa y diferente punto isoeléctrico (Figura 69).

En ensayos preliminares de identificación proteica mediante MALDI-TOF-TOF MS/MS, se identificaron la proteína Myh14 (“spot 1”) y el precursor de la proteína regulada por glucosa (“spot 2”) (Figura 69, Tabla 23). Estos resultados necesitan ser confirmados en ensayos adicionales para mejorar los parámetros de identificación y para detectar un mayor número de dianas en la electroforesis bidimensional.



**Figura 69: Detección e identificación de proteínas de macrófagos de ratón modificadas por AX biotinilada mediante Western blot y MALDI-TOF-TOF MS/MS.** Se realizó el tratamiento de una línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) durante 24 horas con AX biotinilada a 1 mg/ml preparada en PBS y tras el tratamiento se obtuvieron los lisados celulares con tampón de homogeneización y lisis mecánica. Detección de los aductos de proteínas con AX biotinilada analizando por duplicado una alícuota de 100 µg de proteína mediante electroforesis bidimensional. Tras la electroforesis uno de los geles se usó para la detección de proteínas modificadas por AX biotinilada mediante Western blot con estreptavidina-HRP y detección por ECL y el otro gel se usó para la detección de proteínas totales mediante tinción con Coomassie. Los “spots” de interés se escindieron del gel teñido, se tripsinizaron y se identificaron mediante análisis de huella peptídica.

**Tabla 23:** Identificación de proteínas de macrófagos de ratón modificadas por AX biotinilada mediante análisis de huella peptídica por espectrometría de masas.

Nº spot <sup>a</sup>	Nombre proteína	Código de acceso <sup>b</sup>	Puntuación total <sup>c</sup>	Puntuación de iones <sup>d</sup>	Peso molecular (Da) <sup>e</sup>	Péptidos coincidentes <sup>f</sup>
1	Myh14	gi 32484193	51		69397	5
2	Precursor de la proteína regulada por glucosa	gi 25742763	342	6, 19, 2, 31, 16	72473	19

<sup>a</sup> Nº de “spot” del gel de electroforesis bidimensional teñido con Coomassie (Figura 69)

<sup>b</sup> Código de acceso de la proteína en la base de datos del NCBI

<sup>c</sup> Puntuación de probabilidad total de Mascot

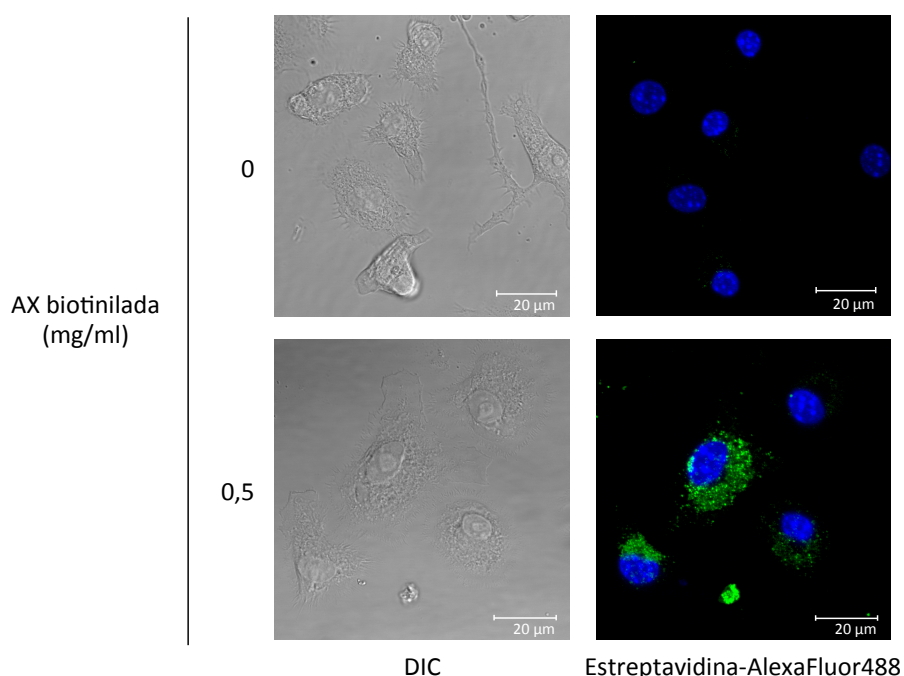
<sup>d</sup> Puntuación de probabilidad de iones de Mascot

<sup>e</sup> Peso molecular teórico (Da)

<sup>f</sup> Nº de péptidos coincidentes

### 7.2.2. Visualización de la distribución celular de proteínas modificadas por AX biotinilada mediante microscopía de fluorescencia

Se analizó el empleo de la AX biotinilada en la visualización de la distribución celular de las proteínas celulares modificadas por el fármaco mediante microscopía de fluorescencia. Siguiendo con los tratamientos de la línea celular de macrófagos de ratón (Raw 264.7) descritos en los apartados anteriores, se realizaron tratamientos de 24 horas con AX biotinilada retirando previamente del medio de cultivo los antibióticos y el FBS. La observación de estas células con el microscopio confocal de fluorescencia mostró un claro incremento de la señal de biotina intracelular correspondiente a las proteínas modificadas por la AX biotinilada distribuidas por todo el citoplasma con respecto a las células control en las que sólo se observó una señal de fluorescencia débil procedente de las proteínas biotiniladas endógenas (Figura 70). A partir de estas condiciones experimentales en las que se podían observar de forma específica y con una alta sensibilidad las proteínas modificadas por AX biotinilada, se deberían abordar en experimentos futuros estudios detallados de colocalización celular con marcadores de compartimentos celulares para caracterizar la distribución celular de algunas de las dianas celulares de la AX biotinilada.



**Figura 70: Distribución celular de proteínas biotiniladas en macrófagos de ratón tras el tratamiento con AX biotinilada.** Los macrófagos de ratón (Raw 264.7) se trataron con AX biotinilada a 0,5 mg/ml durante 24 horas. Para la detección de las proteínas modificadas con AX biotinilada las células se incubaron con estreptavidina-AlexaFluor488

(verde) y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Para su observación al microscopio confocal de fluorescencia las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. Las imágenes mostradas corresponden a proyecciones totales de células.



## **VI. Discusión**

---



## 1. Valoración del papel de los determinantes menores de la AX en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a AX

Las variaciones que se producen en los hábitos de consumo de los antibióticos a lo largo del tiempo debido a la aparición de nuevos compuestos farmacológicos están asociadas a modificaciones en los patrones de frecuencia de las reacciones alérgicas a los diferentes antibióticos BLs. El determinante mayor de la BP conocido como BPO ha sido durante muchos años la estructura reconocida principalmente por los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos a antibióticos BLs y se sigue empleando en las pruebas diagnósticas, pero actualmente este determinante ya no es el más relevante debido al descenso en el consumo de la BP que ha sido reemplazada progresivamente por nuevos antibióticos BLs como la AX y la combinación AX-CLV.

Como consecuencia de estos cambios en los patrones de sensibilización, la sensibilidad de las pruebas cutáneas realizadas con los determinantes de la BP (PPL y MDM) ha disminuido con el transcurso del tiempo. En estudios realizados en la población española se ha observado un descenso en la sensibilidad de estas pruebas desde el 77,7% al 42,1% y al 22,1% (Blanca *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2001; Blanca *et al.*, 2007) y en estudios realizados en otros países se han observado resultados similares (Bousquet *et al.*, 2005; Ponvert *et al.*, 2007; Abuaf *et al.*, 2008). La sensibilidad de las pruebas cutáneas mejoró al incluir la AX en la batería de haptenos empleada de forma rutinaria en la clínica por lo que el empleo de la AX se contempla en la aproximación diagnóstica recomendada por el grupo ENDA (Torres *et al.*, 2003; Blanca *et al.*, 2009). Sin embargo, la sensibilidad de estas pruebas sigue sin ser óptima con unos valores comprendidos entre el 50-70%, por lo que más del 30% de los casos con una historia clínica clara de reacción alérgica a BLs podrían tener pruebas cutáneas con resultados negativos.

El hecho que de la AX sea actualmente el fármaco involucrado con mayor frecuencia en el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad mediadas por un mecanismo inmunológico definido hace necesaria la búsqueda de nuevos determinantes de la AX que puedan contribuir a aumentar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas y a mejorar el diagnóstico de estos pacientes. En este trabajo hemos analizado la relevancia del uso del ácido amoxiciloico y de la dicetopiperacina junto con la AX en las pruebas cutáneas y en pruebas *in vitro*.

Observamos que las concentraciones empleadas en las pruebas cutáneas (1, 5 y 10 mg/ml) no eran irritantes en el grupo control y eran seguras en el grupo de pacientes. Al analizar los resultados obtenidos en las pruebas cutáneas se observó que en pacientes selectivos a AX con pruebas cutáneas previas positivas a AX, el 81,8% de los casos fueron positivos de nuevo a AX, el 30,3% al ácido amoxiciloico y el 6,1% a la dicetopiperacina. El motivo por el que en las nuevas pruebas cutáneas no todos los casos tuvieron resultados positivos a AX se atribuye al intervalo de tiempo transcurrido entre la evaluación diagnóstica inicial, en la que todos los pacientes tuvieron pruebas cutáneas positivas, y la realización de las nuevas pruebas cutáneas, período durante el cual los resultados se pudieron negativizar en algunos de estos pacientes selectivos (Fernandez *et al.*, 2009). En los casos con reactividad cruzada entre penicilinas, con pruebas cutáneas positivas a PPL, MDM o BP, el 50% de los pacientes tuvieron resultados positivos a AX, el 44,4% positivos a ácido amoxiciloico y no hubo ningún caso positivo a dicetopiperacina. Finalmente, en los pacientes con pruebas cutáneas negativas diagnosticados como alérgicos selectivos a AX por administración controlada del fármaco los resultados siguieron siendo negativos en las pruebas cutáneas realizadas con los nuevos determinantes menores de AX.

Estos resultados mostraron que el empleo de estos dos nuevos determinantes de la AX no contribuye a mejorar la sensibilidad de las pruebas cutáneas porque la AX fue la estructura con la que se obtuvieron un mayor número de casos positivos y todos los pacientes que tuvieron resultados positivos a ácido amoxiciloico y/o a dicetopiperacina también tuvieron resultados positivos a AX, no aportando ninguna información al diagnóstico de estos sujetos. Por otro lado, el hecho de que la dicetopiperacina sea una sustancia ubicua presente en la naturaleza y que también es producida en humanos (Prakash *et al.*, 2002) podría haber influido en la baja sensibilización a este compuesto detectada en nuestro estudio.

Estos hallazgos difieren de aquellos previamente descritos en la realización de pruebas cutáneas con determinantes de la BP en sujetos alérgicos a penicilinas, en los que el uso de determinantes menores de la BP aumentaba la sensibilidad de estas pruebas (Sullivan *et al.*, 1981; Mendelson *et al.*, 1984; Macy *et al.*, 1997). En estos estudios, el 5,12% de los pacientes tuvieron resultados positivos sólo al ácido bencilpeniciloico (Sullivan *et al.*, 1981) y el 14-20% a la mezcla de ácido bencilpeniciloico y bencilpeniloico (Mendelson *et al.*, 1984; Macy *et al.*, 1997). A

pesar de que los pacientes con reactividad cruzada entre penicilinas de nuestro estudio podría ser equivalente a los sujetos incluidos en estos estudios previos, sus características de sensibilización eran diferentes porque aunque todos tenían reactividad cruzada entre penicilinas, en los pacientes de nuestro estudio la AX fue probablemente el fármaco sensibilizador y el que probablemente desencadenó la reacción alérgica mientras que en los estudios previos fue la BP.

Los resultados obtenidos en el TAB y en los ensayos de inhibición del RAST con el ácido amoxiciloico y la dicetopiperacina coincidieron con los obtenidos en las pruebas cutáneas. En el TAB realizado sólo en los pacientes con pruebas cutáneas positivas se obtuvieron resultados positivos a AX en el 50,9% de los casos, a ácido amoxiciloico en el 29,4% y a dicetopiperacina en el 7,8%, y como sucedió en las pruebas cutáneas todos los pacientes con resultados positivos a ácido amoxiciloico y/o a dicetopiperacina eran también positivos a AX. Los estudios de inhibición del RAST mostraron que los anticuerpos IgE específicos frente a AX reconocían la AX y el ácido amoxiciloico, si bien el reconocimiento de la AX fue superior al del ácido amoxiciloico en los pacientes selectivos y en todos los casos analizados la dicetopiperacina no era reconocida de forma significativa. Según estos resultados, el determinante antigénico que reconoce principalmente los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX está constituido por la estructura de la AX o de otros metabolitos de la AX diferentes al ácido amoxiciloico y a la dicetopiperacina por lo que el uso de estos dos determinantes menores no mejora la sensibilidad de las pruebas diagnósticas.

## **2. Estudio de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por la combinación AX-CLV**

En los últimos años ha aumentado el número de pacientes que acuden a los servicios de alergología con reacciones alérgicas inmediatas tras la administración de AX-CLV, posiblemente debido al incremento de su consumo en la sociedad. La mayoría de los estudios previos sugerían que la AX era la responsable de estas reacciones alérgicas (Torres *et al.*, 2001; Bousquet *et al.*, 2005; Ponvert *et al.*, 2007; Bousquet *et al.*, 2008), mientras que sólo existían algunos casos en los que se sugería que el CLV podría ser el causante de algunas de estas reacciones (Fernandez-Rivas *et al.*, 1995; Cahen y Wuthrich 1997; Gonzalez Mancebo *et al.*, 2002; Raison-Peyron *et al.*, 2003; Longo *et al.*, 2008).

La estructura química del CLV presenta importantes diferencias con respecto al grupo de las penicilinas, como la ausencia de cadena lateral y la sustitución del anillo de tiazolidina por un anillo de oxazolidina. Estas diferencias químicas pueden contribuir a la generación de epítomos con muy poca o ninguna reactividad cruzada con los derivados de BP y AX. Además, el metabolismo del CLV es diferente al de las penicilinas, generando productos que no están químicamente relacionados con los derivados de las mismas. Por otro lado, los primeros estudios sugerían que el CLV tenía muy poca capacidad inmunogénica, posiblemente debido a que la interacción de su anillo BL con los grupos amino de proteínas generaba determinantes antigénicos inestables (Edwards *et al.*, 1988). Todas estas observaciones han contribuido a que se asumiera que en las reacciones alérgicas inmediatas a AX-CLV los anticuerpos IgE estaban dirigidos principalmente frente a la AX o estructuras derivadas de la misma, no considerándose la posible capacidad antigénica del CLV. Sin embargo, con el aumento que ha experimentado en los últimos años el consumo de la combinación AX-CLV ha aumentado considerablemente el número de personas que han sufrido una reacción alérgica inmediata tras la administración de esta combinación pero que toleran hasta dosis terapéuticas la AX, lo que ha llevado a replantearse la verdadera capacidad antigénica del CLV. Llegados a este punto, la principal dificultad en el diagnóstico de posibles respuestas inmediatas al CLV es la falta de pruebas *in vivo* e *in vitro* específicas para este fármaco.

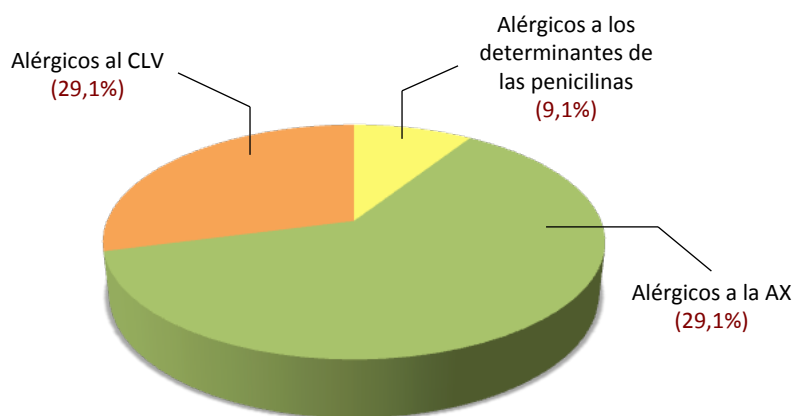
En nuestro estudio realizado con pacientes que habían acudido al servicio de alergología por haber sufrido una reacción adversa tras la administración de AX-CLV, se confirmó que casi el 30% de todos los pacientes evaluados sufrieron una reacción alérgica inmediata a AX-CLV. Algo más del 70% de estos pacientes alérgicos confirmados se diagnosticaron a partir pruebas cutáneas con resultados positivos y el resto se diagnosticaron gracias a la administración controlada del fármaco. A partir de los pacientes alérgicos con pruebas cutáneas positivas se pudieron definir 3 grupos en función del determinante para el que se obtuvieron los resultados positivos en las pruebas cutáneas.

El grupo formado por pacientes que reconocían los determinantes de BP sólo representaba el 9% de los pacientes con pruebas cutáneas positivas. Debido a que el fármaco responsable de la reacción fue la combinación AX-CLV y a que los resultados de las pruebas cutáneas fueron positivos a diferentes determinantes de penicilina, se consideró que los pacientes incluidos en este grupo presentaban

reactividad cruzada con los diferentes determinantes de las penicilinas pero no con el CLV, como se esperaba por las características de la estructura química del mismo. Este grupo estaba compuesto por el menor número de pacientes, resultados que confirmaban que la sensibilización frente a estos determinantes tiende a disminuir debido a que la BP es un fármaco que se prescribe en la actualidad con mucha menos frecuencia que la AX o que la combinación AX-CLV (Blanca *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2001; Bousquet *et al.*, 2005).

En el grupo formado por pacientes que reconocían de forma específica los determinantes de la AX se incluyeron el mayor número de casos (62%), lo que indica que la AX sigue siendo el hapteno que induce con mayor frecuencia la sensibilización de pacientes a antibióticos BLs (Torres *et al.*, 2001; Bousquet *et al.*, 2005; Ponvert *et al.*, 2007; Abuaf *et al.*, 2008).

El grupo formado por aquellos pacientes que reaccionaron de forma específica frente al CLV representaba el 30% de los pacientes con pruebas cutáneas positivas. Aunque todos los pacientes de este grupo tenían pruebas cutáneas positivas a CLV, sólo el 62,5% de esos casos se diagnosticaron mediante pruebas cutáneas positivas a AX-CLV (Figura 71).



**Figura 71:** Pacientes diagnosticados de haber sufrido una reacción alérgica inmediata a AX-CLV con pruebas cutáneas positivas.

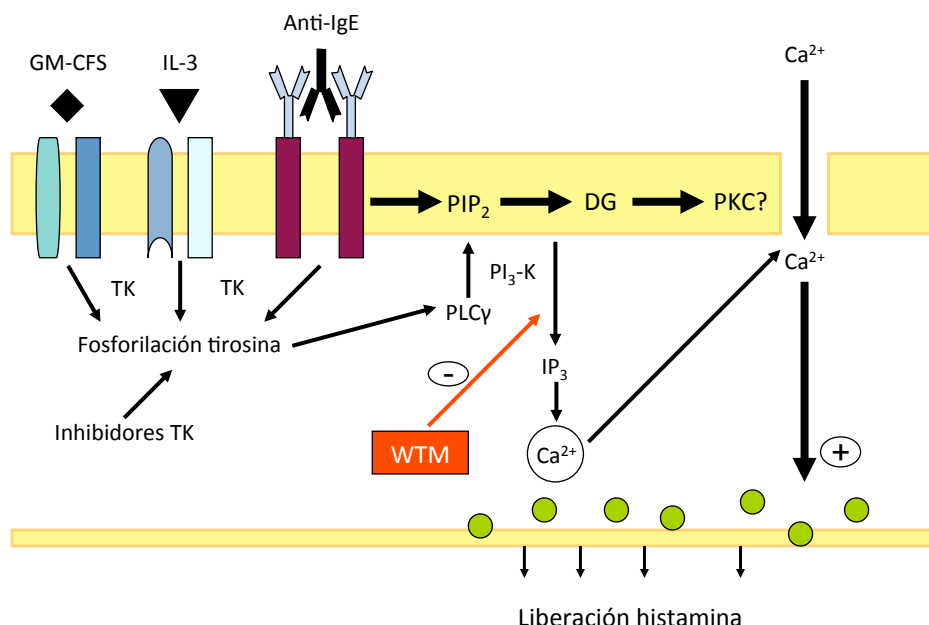
La sensibilidad de las pruebas cutáneas con determinantes de antibióticos BLs depende de la concentración de reactivo empleada, por lo que creemos que las diferencias observadas en el número de pruebas cutáneas positivas a CLV y AX-CLV están relacionadas con la concentración de CLV empleada, ya que en la combinación AX-CLV el CLV está en una concentración 5 veces inferior a la de la AX. De acuerdo con nuestro estudio, la concentración óptima para la realización de las pruebas

cutáneas con el CLV es 20 mg/ml y para alcanzar una concentración similar de CLV usando la combinación AX-CLV la concentración de AX sería 100 mg/ml, 5 veces superior a la concentración máxima recomendada, lo que impide su uso por la aparición de resultados falsos positivos. Este hecho también explicaría que usando solamente la combinación AX-CLV no se hubieran podido detectar un mayor número de casos con pruebas cutáneas negativas a AX y positivas a AX-CLV, lo que habría puesto de manifiesto mucho antes que el CLV era el responsable de la reacción.

Al comparar los 3 grupos descritos con respecto a la edad de los pacientes y el tiempo transcurrido entre la reacción y el estudio alergológico, sólo encontramos diferencias significativas entre la edad de los pacientes. La media de edad más elevada correspondía al grupo de pacientes alérgicos a determinantes de BP y la media de edad inferior al grupo de pacientes que reconocían específicamente al CLV, lo que indica que el CLV induce la sensibilización de pacientes más jóvenes porque es la estructura BL que se ha incorporado más recientemente en el tratamiento antibiótico de pacientes.

El patrón de respuesta observado en los estudios del TAB confirmó la existencia de estos 3 grupos, con pacientes que reconocían determinantes de las penicilinas, determinantes específicos de la AX y determinantes específicos del CLV. Debido a que a la activación de los basófilos podría ser inducida por mecanismos no mediados por IgE ya que en la actualidad no se dispone de métodos *in vitro* para la detección de IgE específica a CLV, tratamos de confirmar que se trataba de una respuesta mediada por anticuerpos IgE inhibiendo la activación de los basófilos con la WTM, un inhibidor de la PI3-K. La PI3-K es una de las quinasas más importantes activadas por el receptor FcεRI (de alta afinidad) y está implicada en la regulación de la liberación de histamina (Miura y MacGlashan, 2000) (Figura 72). Aunque la inhibición de la PI3-K con WTM puede también inhibir la activación de los basófilos mediada por IL-3 y GM-CSF, estas citoquinas no son capaces de inducir la expresión de CD63 en superficie. Los resultados de la inhibición del TAB con WTM en pacientes con un TAB positivo a CLV mostraron una clara inhibición en la activación de los basófilos tras el uso de la WTM como consecuencia de la inhibición de la vía de activación de los basófilos mediada por IgE, ya que se observó inhibición de la activación en el control positivo con anti-IgE y en cambio no se produjo inhibición de la activación en el control positivo con fMLP que activa a los basófilos por una vía no mediada por IgE.



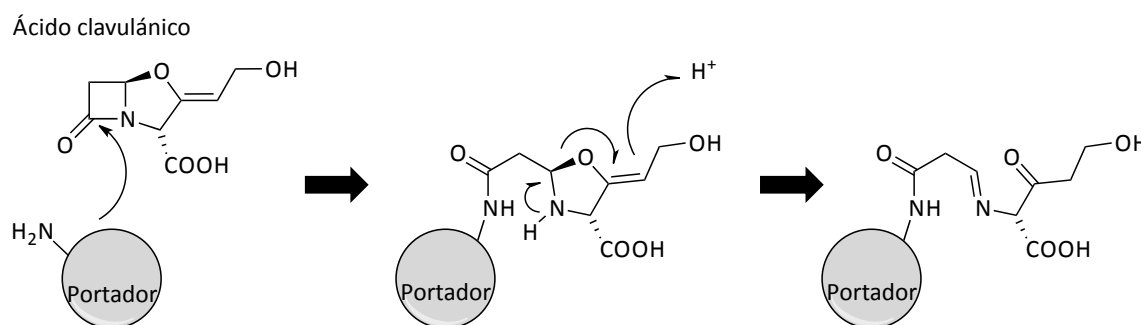


**Figura 72: Esquema propuesto para el mecanismo de señal de transducción asociada con la activación de basófilos por anti-IgE, IL-3 y GM-CSF.** Después de que un anticuerpo anti-IgE se una a dos moléculas de IgE unidas a sus receptores expresados en la superficie celular de los basófilos (FcεRI) o la IL-3 y la GM-CSF se unan a sus receptores de membrana, la activación tirosina quinasa (TK) conduce a la fosforilación de los residuos de tirosina y a la activación de la fosfolipasa Cγ (PLCγ), con la hidrólisis de la fosfatidilinositol-4,5-bis-fosfato (PIP<sub>2</sub>) y la generación de 1,2-diacilglicerol (1,2-DG). El siguiente paso es la activación de PI3-K, con el consiguiente aumento en la concentración intracelular de inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Estas moléculas actúan como segundos mensajeros y provocan la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los compartimentos intracelulares y la activación de la proteína quinasa C (PKC). La movilización de Ca<sup>2+</sup> desde los compartimentos intracelulares provoca la entrada desde el espacio extracelular y la liberación de gránulos citoplasmáticos que contienen histamina. Ciertas observaciones experimentales indican que el papel degranulatorio de la PKC en la activación de basófilos inducida por anti-IgE, IL-3 y GM-CSF es poco probable. Imagen tomada de Tedeschi *et al.*, 2000.

Además, pudimos observar una negativización del TAB a lo largo del tiempo en pacientes a los que se les hizo un estudio seriado, lo que coincide con la naturaleza de las reacciones mediadas por IgE frente a estructuras BLs, para las que se ha podido comprobar que existe una tendencia a la negativización debido a que los niveles elevados de IgE persisten en el organismo durante un corto período de tiempo en comparación con los de IgG (Dessein *et al.*, 1980) y esta tendencia es más pronunciada en aquellos pacientes con una reacción selectiva a un fármaco en comparación con los no selectivos (Posadas *et al.*, 1997; Blanca *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2009). Por tanto, aunque no hemos podido detectar de forma

directa anticuerpos IgE específicos frente a CLV mediante radioinmunoensayo, consideramos que los resultados obtenidos en la inhibición del TAB con WTM y la negativización de la respuesta a lo largo del tiempo apoyan la existencia de una respuesta mediada por IgE.

Hasta el momento se desconoce la estructura química derivada del CLV que es reconocida por los anticuerpos IgE, pero se sabe que se pueden generar productos estables a partir de un intermediario resultado de la apertura del anillo BL y de la oxazolidina (Finn *et al.*, 1984) mediante un mecanismo similar al que se ha postulado en la formación de aductos con betalactamasas (Tremblay *et al.*, 2008), pudiendo ser estos productos los candidatos implicados en la sensibilización y reconocimiento por la IgE de pacientes con reacciones selectivas y que se deben incluir en futuros ensayos (Figura 73).



**Figura 73:** Estructura química y formación de determinante del CLV.

### 3. Estudio del papel de proteínas séricas y celulares en la formación de los determinantes antigénicos reconocidos por el SI

No se conocen bien las bases moleculares y los mecanismos implicados en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos, por lo que es imprescindible profundizar en este punto con una aproximación multidisciplinar para lograr una mejor comprensión del proceso y así poder mejorar en un futuro las técnicas diagnósticas y el análisis de sus resultados.

Se han postulado varias hipótesis para explicar el mecanismo por el que los fármacos son capaces de inducir una respuesta inmunológica, pero el modelo tradicionalmente aceptado por la comunidad científica es la hipótesis del hapteno propuesta por Landsteiner en 1935 (Landsteiner y Jacobs, 1935) que se basa en el concepto de que los fármacos y sus metabolitos son estructuras hapténicas que necesitan unirse covalentemente a macromoléculas portadoras para poder

estimular el SI. Según este modelo, cuando se administra un fármaco se produce la modificación de proteínas endógenas y los aductos fármaco-proteína generados son los responsables de la estimulación del SI (Landsteiner y Jacobs, 1935; Park *et al.*, 1998; Lavergne *et al.*, 2008;), por lo que el proceso de haptización sería clave en la patogénesis de las reacciones de hipersensibilidad (Levine y Fellner, 1965; Park *et al.*, 1998; Pichler *et al.*, 1998). Sin embargo, hasta el momento no se conoce la naturaleza de todas las proteínas que pueden intervenir en el proceso de haptización ni la relevancia que tienen en el desarrollo de las reacciones alérgicas.

Se sabe que muchos de los fármacos que inducen reacciones de hipersensibilidad con una alta prevalencia tienen capacidad de formar aductos covalentes con proteínas y existen estudios que han demostrado que los fármacos inducen la activación de las células T por modificación covalente de proteínas (Brander *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1996; Padovan *et al.*, 1997; Castrejon *et al.*, 2010; Elsheikh *et al.*, 2010), pero la falta de métodos bioanalíticos suficientemente sensibles para caracterizar los aductos generados y la escasez de estudios que determinen las características químicas de la unión de fármacos a proteínas en pacientes sometidos a un tratamiento farmacológico dificulta la caracterización de los aductos antigénicos y el análisis de su capacidad inmunogénica. Debido a que hasta el momento no se ha podido dilucidar con exactitud el mecanismo de haptización en el contexto de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos, algunos científicos han cuestionado el modelo de la hipótesis del hapteno y han propuesto otros modelos como el “p-i concept”, respaldado por algunos estudios que han demostrado que hay fármacos que pueden activar las células T a través de interacciones no covalentes (Schnyder *et al.*, 1997; Schnyder *et al.* 2000; Burkhart *et al.*, 2001; Hashizume *et al.*, 2002; Farrell *et al.*, 2003; Naisbitt *et al.*, 2003b; Nassif *et al.*, 2004; Depta *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2010).

Con el fin de contribuir a lograr una caracterización detallada del proceso de haptización por fármacos y a evaluar su relevancia en el desarrollo de las reacciones alérgicas inmediatas a antibióticos BLs, en el presente trabajo se ha analizado el papel que desempeñan varias estructuras portadoras conjugadas a AX en el reconocimiento por los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX y se ha comenzado a optimizar diferentes herramientas que nos permitan profundizar en la detección, identificación y caracterización de las proteínas candidatas a intervenir en los procesos de haptización.

### **3.1. Identificación de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a AX**

En una primera aproximación para estudiar la relevancia de la naturaleza de las proteínas haptinizadas en la conformación del determinante antigénico, se analizó mediante ensayos de inhibición del RAST el reconocimiento de anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos a la AX frente a diferentes aductos formados por AX conjugada a varias moléculas portadoras (HSA, PLL y BA), a derivados de la AX como el ácido amoxiciloico y a la AX sin conjugar previamente a una molécula portadora. A partir de este estudio se pudieron diferenciar principalmente 2 patrones de reconocimiento asociados a 2 grupos de pacientes, de este modo observamos que los pacientes alérgicos selectivos a la AX reconocían mejor la AX cuando se empleaba como inhibidor sin conjugar previamente a ninguna molécula portadora con respecto al resto de estructuras analizadas, y que los pacientes alérgicos con reactividad cruzada entre penicilinas reconocían de forma similar o peor la AX sin conjugar previamente a ninguna estructura que la conjugada a HSA, PLL y BA, con un menor reconocimiento del ácido amoxiciloico.

En los pacientes selectivos a AX la unión y la naturaleza de la molécula portadora influía en el reconocimiento de la AX por la IgE. Aunque la estructura principalmente reconocida por estos pacientes era la AX sin conjugar previamente a una molécula portadora, en los ensayos de inhibición del RAST la AX se puede unir a proteínas séricas durante su incubación con el suero y es posible que una o varias de estas proteínas modificadas por AX constituyan la estructura macromolecular reconocida por la IgE de estos pacientes. Entre las proteínas séricas que podrían estar contribuyendo a un mejor reconocimiento de la AX se debe incluir la HSA a pesar de que en el ensayo ya se incluyera AX conjugada a HSA porque en este último caso se trató de una modificación exhaustiva utilizando altas concentraciones de AX (relación molar HSA:AX de 1:1800) y en un medio alcalino, por lo que el número y la distribución de las moléculas de AX unidas a la HSA podría ser diferente así como las propiedades inmunogénicas del aducto generado con respecto al formado durante el ensayo de inhibición a concentraciones inferiores de AX (relación molar HSA:AX de 1:4,45; 1:44,5 y 1:445), a pH neutro y en presencia del resto de proteínas y componentes séricos. El ácido amoxiciloico también se usó sin conjugar a ninguna estructura, pero durante el ensayo de inhibición no es posible que se una covalentemente a proteínas séricas mediante el ataque nucleofílico del grupo amino

de la proteína al anillo BL porque en el ácido amoxiciloico la betalactama ya está abierta, y no es probable la unión a proteínas a través del resto de grupos funcionales en las condiciones en las que se realiza la inhibición del RAST.

Por el contrario, en los pacientes con reactividad cruzada entre penicilinas parecía que el reconocimiento de la AX era independiente de la naturaleza de la molécula portadora. El hecho de que el ácido amoxiciloico en general se reconociera peor que la AX conjugada a moléculas portadoras y que la AX sin conjugar previamente pero con posibilidad de unirse a proteínas séricas durante el ensayo de inhibición, refuerza la idea de la necesidad de que la AX esté unida a una molécula portadora para que su reconocimiento por el SI sea óptimo, independientemente de las características de la molécula portadora.

A partir de esta observación tratamos de determinar si existían diferencias entre las proteínas séricas haptinizadas por AX durante los ensayos de inhibición del RAST entre pacientes selectivos a AX, con reactividad cruzada entre penicilinas y controles sanos no alérgicos. Los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras por electroforesis monodimensional y Western blot mostró que las proteínas haptinizadas eran las mismas en los 3 casos. Estos resultados parecen indicar que las proteínas séricas modificadas *in vitro* por AX son las mismas en cualquier individuo y que la existencia de 2 patrones de reconocimiento en función de que se trate de pacientes selectivos o con reactividad cruzada debe estar relacionada con la estructura antigénica reconocida por la IgE anti-AX de los pacientes independientemente de la naturaleza de la proteína portadora.

En los pacientes selectivos a AX, cuya IgE específica está dirigida contra la cadena lateral, es necesario que la cadena lateral de la AX esté conservada y expuesta a la IgE en los aductos formados con moléculas portadoras y es posible que los aductos que se forman durante el ensayo de inhibición sean más relevantes al generarse en unas condiciones más cercanas a las condiciones fisiológicas con respecto a los aductos empleados como inhibidores que se obtuvieron en condiciones de pH y de concentración de fármaco muy diferentes a las fisiológicas para conseguir una modificación exhaustiva de la molécula portadora.

En el caso de los pacientes con reactividad cruzada entre penicilinas sus anticuerpos IgE anti-AX reconocen una estructura común de las penicilinas y no es relevante que la cadena lateral del fármaco quede expuesta en la conformación final del aducto, lo que explicaría que no se observaran diferencias en el reconocimiento

de las estructuras generadas en condiciones de modificación exhaustiva con respecto a las obtenidas en el transcurso del ensayo de inhibición.

### **3.2. Obtención de herramientas para la detección de proteínas séricas y celulares modificadas por AX**

Para mejorar la comprensión y el análisis de los resultados observados en los ensayos realizados con muestras de pacientes se ha analizado la utilidad de nuevas herramientas para la detección, identificación y caracterización de dianas proteicas séricas y celulares de la AX candidatas a intervenir en los procesos de haptización y así poder realizar posteriormente un estudio detallado sobre la implicación y la relevancia de las mismas en el desarrollo de las respuestas alérgicas a fármacos.

Los métodos inmunológicos se han usado previamente en la detección de aductos de proteínas y antibióticos BLs (Magi *et al.*, 1995; Carey y van Pelt, 2005; Meng *et al.*, 2011; Whitaker *et al.*, 2011), y en este trabajo se ha optimizado un sistema de detección inmunológica empleando anticuerpos monoclonales anti-AX desarrollados por nuestro grupo de investigación dirigidos frente a distintas regiones de la molécula de AX y que habían sido caracterizados previamente mediante ensayos de competición de ELISA (Mayorga *et al.*, 1995). Tras evaluar su capacidad para detectar HSA modificada *in vitro* por AX mediante Western blot observamos señal inmunorreactiva con los anticuerpos AO3.2 y AO19.1. Estos dos anticuerpos son selectivos frente a la molécula completa de la AX, se han generado contra su cadena lateral pero necesitan la presencia de la molécula completa para que el reconocimiento sea óptimo. Concretamente, con el anticuerpo AO3.2 se pudo detectar señal inmunorreactiva con aductos de HSA-AX generados en presencia de concentraciones de AX comprendidas entre los niveles de concentración que se pueden alcanzar *in vivo* tras la administración del fármaco (Serrano *et al.* 1989; Hoizey *et al.* 2002,) por lo que este procedimiento es de alta sensibilidad y puede ayudar a la detección de aductos generados *in vivo*. La HSA tiene una vida media de 28-36 días lo que permitiría que esta proteína modificada por fármacos se acumulara a lo largo del tratamiento con el antibiótico, favoreciendo su detección inmunológica a pesar de que su vida media disminuyera al formar aductos con otras moléculas (Kitteringham *et al.*, 1985).

Sin embargo con el resto de anticuerpos anti-AX empleados en el Western blot no se pudieron detectar los aductos generados *in vitro*. Estos anticuerpos se han generado contra la cadena lateral de la AX y reaccionan fundamentalmente

frente al grupo hidroxilo y amino de su cadena lateral (AO18.2 y AO24.1) o se han desarrollado frente a la cadena lateral de la AX pero con una alta reactividad cruzada entre las cadenas laterales de diferentes penicilinas (AO14.1). Es posible que esta diferencia en el reconocimiento con respecto a los anticuerpos AO3.2 y AO19.1 sea la que determine la capacidad de detección de aductos con AX en Western blot, al menos en el caso de la HSA, sin olvidar que en el Western blot los anticuerpos monoclonales reconocen la AX unida a una proteína desnaturalizada, no en condiciones nativa como sucede en los radioinmunoensayos con los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos. Además se ha comprobado que en este tipo de ensayos la sensibilidad del anticuerpo AO3.2 en cuanto a la detección de AX es superior a la del anticuerpo monoclonal comercial antipenicilina que se ha empleado en otros estudios (Meng *et al.*, 2011; Whitaker *et al.*, 2011).

Con respecto al uso de la AX biotinilada como herramienta para la detección e identificación de nuevas dianas séricas y celulares, este reactivo puede ser útil para realizar una selección preliminar de posibles proteínas candidatas al aumentar la sensibilidad de detección mediante Western blot o de la visualización de su distribución celular mediante microscopía de fluorescencia. Además puede contribuir a enriquecer de un modo sencillo muestras complejas que contengan proteínas modificadas por AX biotinilada, pudiendo lograr la detección de proteínas que estén en baja proporción en estas muestras o que presenten un grado de modificación bajo. Hay que tener presente que los resultados que se obtengan con la AX biotinilada deben ser confirmados posteriormente con AX, ya que la unión de la biotina a nivel de la cadena lateral de la AX y las diferencias de peso molecular entre la AX y la AX biotinilada pueden afectar a la modificación de las proteínas, y puede ocurrir que el número y la distribución de los residuos modificados o incluso la conformación final de la proteína modificada sean diferentes. De hecho, en estudios de reconocimiento del fármaco por anticuerpos que reconocen de forma selectiva a la AX, como el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 o anticuerpos IgE específicos de pacientes selectivos a AX, no se puede emplear la AX biotinilada porque la biotina dificulta el reconocimiento de la AX debido a la relevancia de la estructura de la cadena lateral en la unión de estos anticuerpos.

### **3.3. Identificación de dianas séricas y caracterización de la modificación *in vitro* de HSA por AX**

Aunque ya se han usado métodos inmunológicos para la detección de aductos de proteínas y antibióticos BLs (Carey y van Pelt 2005; Meng *et al.*, 2011; Whitaker *et al.*, 2011), y se han identificado a la HSA y a la transferrina como proteínas diana para la AMP (Magi *et al.*, 1995), la alta sensibilidad de detección lograda con el anticuerpo monoclonal anti-AX AO3.2 puede contribuir a la identificación de nuevas dianas proteicas del proceso haptización por AX.

Con aproximaciones inmunológicas y proteómicas hemos identificado proteínas séricas haptizadas *in vitro* con AX. Nuestros resultados mostraron que además de la HSA otras proteínas séricas, como varias isoformas de la transferrina y las cadenas pesadas y ligeras de las Igs eran modificadas por la AX, siendo necesarios más estudios centrados en la posible implicación de estos aductos en la respuesta inmunológica. Concretamente se debe considerar la modificación de las Igs por la AX en el contexto de la respuesta inmunológica y en la interpretación de los resultados de los inmunoensayos.

Para lograr mejorar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas se debe considerar la identidad de estas proteínas identificadas y las características de su modificación. Hemos podido observar que el grado de modificación por AX es específico de cada proteína, por ejemplo si consideráramos en nuestros ensayos la concentración en plasma de la proteína modificada con respecto a la señal inmunorreactiva detectada, el grado de modificación de la transferrina (2-4 mg/ml en plasma) fue unas 10 veces superior al de la HSA (35-50 mg/ml en plasma). Por tanto, aunque la HSA es la proteína plasmática más abundante, los aductos de AX con otras proteínas pueden desempeñar un papel importante. El hecho de que otras proteínas séricas relativamente abundantes no formaran aductos detectables en nuestras condiciones experimentales parece indicar que existen factores diferentes a la concentración de cada proteína en plasma que pueden determinar o influir en la modificación de las mismas.

Es necesaria la caracterización de la modificación de estas 3 proteínas identificadas (HSA, transferrina e Igs) ya que los trabajos realizados hasta el momento sólo se centran en el estudio de la HSA. En los primeros trabajos realizados por Yvon *et al.* para caracterizar la modificación de la HSA se identificaron 6 sitios principales de unión del grupo peniciloil en la HSA, que fueron la Lys 190,



195, 199, 432, 541 y 545 (Yvon y Wal, 1988; Yvon *et al.*, 1990). Recientemente, usando aproximaciones proteómicas se han caracterizado la modificación de la HSA por flucloxacilina (Jenkins *et al.*, 2009), BP (Meng *et al.*, 2011) y piperacilina (Whitaker *et al.*, 2011) y se ha comprobado mediante ensayos *in vitro* que el grado de modificación de la HSA por estos fármacos es dependiente de la dosis de fármaco empleada y del tiempo de incubación con el mismo. En estos trabajos sólo se han identificado modificaciones en residuos de lisina de la HSA tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* (Tabla 24), y se ha observado que los fármacos tienen preferencia por residuos concretos que se detectan para los tiempos de incubación más cortos y las concentraciones de fármaco más bajas. En el caso de la flucloxacilina los residuos más reactivos son la Lys 190 y 212, para la BP es la Lys 199 y para la piperacilina la Lys 541. Curiosamente, en los ensayos *in vivo* los residuos modificados parecen variar ampliamente entre diferentes sujetos, aunque en el caso de la flucloxacilina siempre aparecen la Lys 190, 212 y 432 junto con otros residuos que sí varían de unos individuos a otros.

Residuo	Flucloxacilina		Bencilpenicilina		Piperacilina	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Lys 4					+	
Lys 12					+	
Lys 20			+	+		
Lys 137		+	+	+	+	
Lys 159			+	+		
Lys 162	+	+			+	
Lys 190	++	+	+	+	+	+
Lys 195	+	+	+	+	+	+
Lys 199	+	+	++	+	+	
Lys 212	++	+	+	+	+	
Lys 351	+	+	+	+	+	
Lys 372				+		
Lys 432	+	+	+	+	+	+
Lys 436				+		
Lys 475						
Lys 525	+	+	+	+	+	
Lys 541	+	+	+	+	++	+
Lys 545	+		+	+	+	

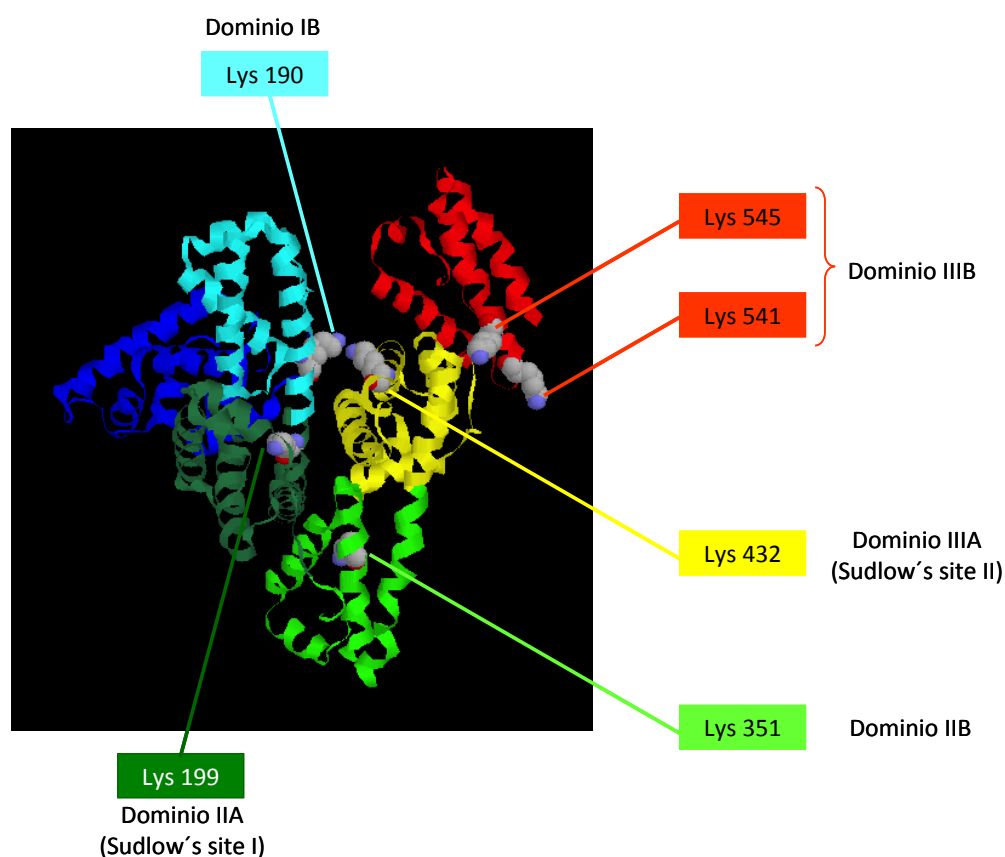
**Tabla 24: Residuos de HSA modificados por flucloxacilina, BP y piperacilina.** Los residuos más reactivos identificados en los tiempos de incubación más cortos o en las concentraciones de fármaco más baja se muestran como (++). Datos tomados de Jenkins *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2011 y Whitaker *et al.*, 2011.

En nuestras condiciones experimentales se detectaron mediante espectrometría de masas de alta resolución interacciones covalentes y no covalentes de HSA con AX. Las interacciones no covalentes se demostraron al observar que el número de moléculas de AX unidas a la HSA disminuía al realizar lavados sucesivos de las muestras con etanol:H<sub>2</sub>O hasta que se detectó un número constante de modificaciones que correspondían con interacciones covalentes. Nuestros datos indican que los aductos covalentes HSA-AX se producen por la formación de un enlace tipo amida entre los aminos primarios de los residuos de lisina de la proteína y el grupo carboxílico del anillo BL de la AX, generando un grupo AXO como producto principal del proceso de haptización. Estas observaciones coinciden con lo que se ha descrito para otras penicilinas (Montañez *et al.*, 2011) y también con los datos de la caracterización por RMN de los aductos AXO-BA (Montañez MI, comunicación personal). Todos los residuos modificados por AX identificados en este trabajo eran lisinas, y esta observación estaba respaldada por los resultados obtenidos en la modificación *in vitro* por AX de péptidos de HSA que contenían residuos nucleofílicos de lisina, histidina o cisteína, según los cuales los residuos de lisina eran los más reactivos frente a la AX y a través de los cuales la HSA podría reaccionar covalentemente con el anillo BL del fármaco (Ariza *et al.*, 2012). Una posible explicación para la ausencia de aductos con otros residuos nucleófilos como la serina, histidina y cisteína es que las interacciones con esos residuos podrían ser demasiado lábiles para detectarse en las condiciones de nuestro ensayo (Tsuji *et al.*, 1975).

Hemos observado mediante ensayos de MALDI-TOF MS que la modificación de la HSA por AX es dependiente de la concentración de fármaco empleada, detectando incrementos de masa de la HSA correspondientes a la incorporación de 1 a 5 moléculas de AX al aumentar la relación molar HSA:AX desde 1:9 hasta 1:180 en ensayos *in vitro* de 16 horas de incubación.

En los experimentos de LC-ESI-MS y LC-ESI-MS/MS para la identificación de los residuos de HSA modificados por AX se alcanzó una cobertura de la secuencia de la HSA del 85-90%, lo que permitió maximizar el número de sitios de modificación detectados. Los principales sitios de unión de la AX a la HSA que se detectaron en los aductos obtenidos en la relación molar HSA:AX más baja empleada (1:9) fueron la Lys 190, 199 y 541, que coincidían con los residuos de mayor reactividad de la HSA identificados para otros fármacos (Jenkins *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2011; Whitaker

*et al.*, 2011). Estudios de análisis computacional han demostrado la reactividad de estos residuos de lisina, confirmando que el microambiente del entorno proteico influye en la reactividad de los residuos y que aunque la accesibilidad del residuo es relevante, no parece ser el único factor que determina su reactividad y podría explicar la selectividad de los sitios de modificación (Ariza *et al.*, 2012). Al aumentar la relación molar HSA:AX hasta 1:90 se identificaron las Lys 190, 199, 351, 432, 541 y 545 como sitios de modificación y hay que considerar la posibilidad de que en futuros estudios de modificación *in vivo* se detecten otros residuos. Es importante señalar que los residuos identificados no se concentraban en un dominio concreto de la proteína, sino que además de identificar sitios de modificación localizados en los subdominios IIA (sitio Sudlow I) y IIIA (sitio Sudlow II), que son bolsillos hidrofóbicos de la HSA implicados en la interacción con ligandos endógenos y fármacos (Sudlow *et al.*, 1975; Fasano *et al.* 2005; Beeler *et al.*, 2006), también había residuos situados en los subdominios IB, IIB y IIIB (Figura 74).



**Figura 74: Modelo de HSA en el que se muestran los residuos de lisina modificados por AX identificados mediante LC-ESI-MS/MS.** Estructura tridimensional de la HSA con los subdominios en diferentes colores (subdominio IA en azul; subdominio IB en turquesa; subdominio IIA en verde oscuro; subdominio IIB en verde claro; subdominio IIIA en amarillo;

subdominio IIIB en rojo). Las coordenadas atómicas se han tomado del código de entrada 1AO6 (Sugio *et al.*, 1999) de la base de datos de proteínas PDB.

Al analizar los sitios de modificación de la HSA a partir de aductos generados *in vitro* incubando suero humano con AX y purificando posteriormente la HSA, se identificaron las Lys 190 y 432 como los principales sitios de modificación detectados a concentraciones bajas de AX. Las diferencias observadas con respecto a la modificación de HSA purificada antes de su modificación por AX en la que se identificaron como residuos más reactivos las Lys 190, 199 y 541 sugieren que el contexto fisiológico de la proteína puede influir en las características de los aductos formados y que quizás en las pruebas diagnósticas para la detección de IgE anti-AX se deberían emplear aductos generados en unas condiciones experimentales que simularan las condiciones fisiológicas.

En todos los individuos se generan aductos proteína-BL tras la administración del fármaco, pero hasta el momento no se conocen los factores que determinan que sólo una minoría desarrolle reacciones de hipersensibilidad frente al mismo. Sería interesante determinar si las alteraciones en la composición del suero que se producen en situaciones fisiopatológicas podrían influir en la hapténización de proteínas y en las características de los aductos generados. Se cree que las “señales de peligro” juegan un papel importante en las reacciones alérgicas, como muestran estudios en los que se ha observado que el sulfametoxazol forma aductos con proteínas en las CPA y que la cantidad de aductos formados aumenta cuando las células están expuestas a endotoxinas bacterianas, citoquinas o a diferentes estímulos inflamatorios o inducidos por el estrés (Lavergne *et al.*, 2009), lo que subraya la importancia de los factores concomitantes en la hapténización de proteínas. Se sabe que la HSA es la diana de lípidos reactivos generados en situaciones de inflamación o de estrés oxidativo, entre los que se incluyen el 4-hidroxi-2-nonenal y las prostaglandinas ciclopentenonas (Aldini *et al.*, 2006; Aldini *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2010), además se ha descrito que la HSA es sensible a varias modificaciones oxidativas (Oetl y Stauber, 2007) y que su modificación oxidativa puede alterar drásticamente sus propiedades de unión a ligandos e incluso su potencial inmunogénico y proinflamatorio (Kormoczi *et al.*, 2001). En este trabajo hemos observado que el pretratamiento de HSA y de suero humano en presencia del agente oxidante GSSG aumenta el grado de modificación *in vitro* por AX de proteínas séricas con respecto a controles sin tratar con GSSG, pudiéndose observar

este incremento de la modificación por la AX en la transferrina, HSA y cadenas pesadas y ligeras de las Igs, siendo la HSA la proteína sérica en la que se detectó un mayor aumento. Según estas observaciones serían necesarios estudios adicionales en los que se incluyeran otros agentes oxidantes y agentes reductores para poder llegar a establecer las bases bioquímicas de estos efectos.

Además hay que considerar la posible participación de proteínas celulares en los procesos de haptización, ya que hay estudios en los que se ha comprobado que derivados de la BP tienen capacidad de unirse a las membranas de los macrófagos (Binderup y Arrigoni-Martelli, 1979; O'Donnell *et al.*, 1991) y de los monocitos (Watanabe *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1987). En el presente trabajo empleamos una línea de celular de macrófagos de ratón como modelo para tratar de identificar algunas proteínas celulares con capacidad de unirse a la AX, pero a partir de nuestras condiciones experimentales no fuimos capaces de detectar ninguna proteína modificada lo que puede ser debido a que se modificaron proteínas que estaban en baja proporción con respecto al total de proteínas presentes en los lisados celulares obtenidos a partir de los cultivos de macrófagos y que no pudieron ser detectadas con las herramientas disponibles. El empleo de la AX biotinilada en el tratamiento de esta línea celular de macrófagos permitió la detección de varias proteínas modificadas pero son necesarios ensayos adicionales para mejorar los parámetros de identificación de estas proteínas y para detectar un mayor número de dianas, teniendo siempre presente que las posibles dianas identificadas tras el tratamiento con AX biotinilada puede que no sean las mismas que se modificarían en presencia de AX.

Este estudio sienta las bases para la detección y la identificación con alta sensibilidad de aductos AX-proteína sérica a través de métodos inmunológicos y proteómicos. Estudios futuros permitirán la identificación de los sitios de modificación de otras proteínas séricas así como la caracterización de la modificación *in vivo* por AX, lo que nos permitiría ampliar la información sobre el proceso de haptización por fármacos y contribuiría al desarrollo de herramientas diagnósticas y a la caracterización de los mecanismos patogénicos de las reacciones alérgicas frente a la AX.



## **VII. Conclusiones**

---





1. El empleo del ácido amoxiciloico y de la dicetopiperacina, como determinantes menores de la AX, en las pruebas cutáneas y en las pruebas diagnósticas *in vitro* (RAST y TAB) no aumenta la sensibilidad de éstas en el diagnóstico de las reacciones alérgicas inmediatas a la AX.
2. Las reacciones alérgicas inmediatas selectivas a CLV representan aproximadamente el 30% de las reacciones alérgicas inmediatas producidas por la combinación AX-CLV en pacientes con pruebas cutáneas positivas a algún determinante BL.
3. La concentración óptima del CLV en las pruebas cutáneas es 20 mg/ml y su empleo en estas pruebas permite diagnosticar al 37,5% de los pacientes alérgicos al CLV con pruebas cutáneas positivas que no habrían podido ser diagnosticados utilizando la combinación AX-CLV.
4. El empleo del CLV en el TAB permite diagnosticar a pacientes alérgicos selectivos al CLV con una sensibilidad del 50% y una especificidad del 86,6%.
5. La AX modifica selectivamente un conjunto de proteínas en suero humano *in vitro*. Aunque las dianas mayoritarias parecen ser las mismas en distintos individuos, nuestros resultados indican que las estructuras antigénicas reconocidas por las IgE de pacientes alérgicos selectivos a AX y pacientes con reactividad cruzada a penicilinas podrían ser diferentes.
6. La transferrina, la HSA y las cadenas pesadas y ligeras de las Igs se modifican *in vitro* por la AX. La concentración plasmática de estas proteínas no determina su capacidad de haptización ya que otras proteínas plasmáticas mayoritarias como la apolipoproteína y la haptoglobina no se modifican en las mismas condiciones.
7. El grado de modificación de las proteínas séricas por AX es dependiente de relación molar proteína:AX. Se ha podido detectar la incorporación de hasta 5 moléculas de AX por cada molécula de HSA en aductos generados con altas concentraciones del fármaco.
8. La presencia de agentes oxidantes o de otras proteínas modula la unión de la AX a la HSA. Esto indica que la modificación de las proteínas séricas por AX podría sufrir cambios en función de alteraciones fisiológicas asociadas a

procesos patológicos como variaciones en el estado redox y en la composición plasmática.

9. Se han identificado las Lys 190, 199 y 541 como los principales sitios de modificación *in vitro* de HSA purificada por AX y las Lys 190 y 432 como los principales sitios de modificación *in vitro* de HSA presente en suero por AX, estando todos estos residuos localizados en diferentes subdominios de la proteína.
10. Las proteínas celulares deben ser consideradas como posibles dianas en los procesos de haptización por AX.

## **Bibliografía**

---



- **Abbas A.K., Lichtman A.H. y Pillai S. (2008a).** Hipersensibilidad inmediata. En: *Inmunología Celular y Molecular*, 6ª edición, 441-463. Madrid, Elsevier.
- **Abbas A.K., Lichtman A.H. y Pillai S. (2008b).** Reconocimiento de antígenos. En: *Inmunología Celular y Molecular*, 6ª edición, 113-137. Madrid, Elsevier.
- **Abbas A.K., Lichtman A.H. y Pillai S. (2012).** *Cellular and Molecular Immunology*, 7<sup>th</sup> edition. Elsevier.
- **Abraham E.P., Chain E., Fletcher C.M., Florey H.W., Gardner A.D., Heatley N.G. y Jennings M.A. (1992).** Further observations of penicillin. 1941. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 42.
- **Abuaf N., Rostane H., Rajoely B., Gaouar H., Autegarden J.E., Leynadier F. y Girot R. (2008).** Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy*, 38, 921-8.
- **Adkinson N.F. (1984).** Risk factors for drug allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 74, 567-72.
- **Adkinson N.F. (2003).** Drug Allergy. En: *Allergy. Principles and Practice*, eds. N. F. Adkinson, J. W. Yunginger, W. W. Busse, B. S. Bochner, S. T. Holgate & F. E. Simmons, 1679-94. Mosby, Philadelphia.
- **Adkinson N.F. (2009).** En: *Middleton's Allergy: Principles and Practice*.
- **Ahlstedt S. y Kristofferson A. (1982).** Immune mechanisms for induction of penicillin allergy. *Prog Allergy*, 30, 67-134.
- **Ahlstedt S. (1984).** Penicillin allergy can the incidence be reduced? *Allergy*, 39, 151-64.
- **Ahmed-Ouameur A., Diamantoglou S., Sedaghat-Herati M.R., Nafisi S., Carpentier R. y Tajmir-Riahi H.A. (2006).** The effects of drug complexation on the stability and conformation of human serum albumin: protein unfolding. *Cell Biochem Biophys*, 45, 203-13.
- **Aihara Y., Ito S.I., Kobayashi Y., Yamakawa Y., Aihara M. y Yokota S. (2003).** Carbamazepine-induced hypersensitivity syndrome associated with transient hypogammaglobulinaemia and reactivation of human herpesvirus 6 infection demonstrated by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Br J Dermatol*, 149, 165-9.
- **Aldini G., Gamberoni L., Orioli M., Beretta G., Regazzoni L., Facino R.M. y Carini M. (2006).** Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *J Mass Spectrom*, 41, 1149-61.

- **Aldini G., Vistoli G., Regazzoni L., Gamberoni L., Facino R.M., Yamaguchi S., Uchida K. y Carini M. (2008).** Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol*, 21, 824-35.
- **Andreu I., Mayorga C. y Miranda M.A. (2010).** Generation of reactive intermediates in photoallergic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10, 303-8.
- **Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U. y Otagiri M. (2001).** Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res*, 18, 632-9.
- **Antunez C., Blanca-Lopez N., Torres M.J., Mayorga C., Perez-Inestrosa E., Montanez M.I., Fernandez T. y Blanca M. (2006a).** Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 404-10.
- **Antunez C., Martin E., Cornejo-Garcia J.A., Blanca-Lopez N., Mayorga C., Torres M.J. y Blanca M. (2006b).** Immediate hypersensitivity reactions to penicillins and other betalactams. *Curr Pharm Des*, 12, 3327-33.
- **Ariza A., Garzon D., Abanades D.R., de Los Rios V., Vistoli G., Torres M.J., Carini M., Aldini G. y Perez-Sala D. (2012).** Protein hapteneation by amoxicillin: High resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. *J Proteomics*.
- **Ascenzi P., Bocedi A., Notari S., Fanali G., Fesce R. y Fasano M. (2006).** Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin. *Mini Rev Med Chem*, 6, 483-9.
- **Ascenzi P. y Fasano M. (2010).** Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys Chem*, 148, 16-22.
- **Asero R. (1998).** Detection of patients with multiple drug allergy syndrome by elective tolerance tests. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 80, 185-8.
- **Astarita C., Harris R.I., de Fusco R., Franzese A., Biscardi D., Mazzacca F.R. y Altucci P. (1988).** An epidemiological study of atopy in children. *Clin Allergy*, 18, 341-50.
- **Atsumi T., Nishida K., Kinoshita Y., Shibata K. y Horiuchi Y. (1967).** The heterogeneity of combining sites of anti-benzylpenicilloyl antibodies obtained from individual rabbits: fractionation of antibodies with a specific immunoabsorbent. *J Immunol*, 99, 1286-93.
- **Attaway N.J. y Strunk R.C. (1989).** Death due to asthma in children: what the pediatrician can do. *Pediatr Ann*, 18, 819-23.
- **Audicana M., Bernaola G., Urrutia I., Echechipia S., Gastaminza G., Munoz D., Fernandez E. y Fernandez de Corres L. (1994).** Allergic reactions to betalactams: studies

in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin. *Allergy*, 49, 108-13.

- **Baldo B.A. y Harle D.G. (1990).** Drug allergenic determinants. En: *Molecular approaches to the study of allergens. Monographs in allergy*, ed. B. A. Baldo. Basel, Karger.

- **Baldo B.A. y Pham N.H. (1994).** Structure activity studies on drug-induced anaphylactic reactions. *Chem Res Toxicol*, 7, 703-21.

- **Baldo B.A., Pham N.H. y Zhao Z. (2001).** Chemistry of drug allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 327-35.

- **Barranco P. y Lopez-Serrano M.C. (1998).** General and epidemiological aspects of allergic drug reactions. *Clin Exp Allergy*, 28 Suppl 4, 61-2.

- **Basomba A., Villalmanzo I.G., Campos A., Pelaez A. y Berglund A. (1979).** IgE antibodies against penicillin as determined by Phadebas RAST. *Clin Allergy*, 9, 515-25.

- **Batchelor F.R., Dewdney J.M., Weston R.D. y W. A.W. (1966).** The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology*, 10, 21-33.

- **Bates D.W., Cullen D.J., Laird N., Petersen L.A., Small S.D., Servi D., Laffel G., Sweitzer B.J., Shea B.F., Hallisey R. et al. (1995).** Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. Implications for prevention. ADE Prevention Study Group. *JAMA*, 274, 29-34.

- **Bayard P.J., Berger T.G. y Jacobson M.A. (1992).** Drug hypersensitivity reactions and human immunodeficiency virus disease. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 5, 1237-57.

- **Beeler A., Engler O., Gerber B.O. y Pichler W.J. (2006).** Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 455-62.

- **Bernstein J.A. (1995).** Nonimmunologic adverse drug reactions. How to recognize and categorize some common reactions. *Postgrad Med*, 98, 120-2, 125-6.

- **Bigby M., Jick S., Jick H. y Arndt K. (1986).** Drug-induced cutaneous reactions. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 consecutive inpatients, 1975 to 1982. *JAMA*, 256, 3358-63.

- **Binderup L. y Arrigoni-Martelli E. (1979).** [14C]-D-Penicillamine: uptake and distribution in rat lymphocytes and macrophages. *Biochem Pharmacol*, 28, 189-92.

- **Bishop C.T., Mirza Z., Crapo J.D. y Freeman B.A. (1985).** Free radical damage to cultured porcine aortic endothelial cells and lung fibroblasts: modulation by culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol*, 21, 229-36.

- **Blanca-Lopez N., Andreu I. y Torres M.J. (2011).** Hypersensitivity reactions to quinolones. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 11, 285-91.
- **Blanca M., Perez E., Garcia J., Miranda A., Fernandez J., Vega J.M., Terrados S., Avila M., Martin A. y Suau R. (1988).** Anaphylaxis to amoxycillin but good tolerance for benzyl penicillin. In vivo and in vitro studies of specific IgE antibodies. *Allergy*, 43, 508-10.
- **Blanca M., Fernandez J., Miranda A., Terrados S., Torres M.J., Vega J.M., Avila M.J., Perez E., Garcia J.J. y Suau R. (1989).** Cross-reactivity between penicillins and cephalosporins: clinical and immunologic studies. *J Allergy Clin Immunol*, 83, 381-5.
- **Blanca M., Vega J.M., Garcia J., Carmona M.J., Terados S., Avila M.J., Miranda A. y Juarez C. (1990).** Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to beta-lactams. *Clin Exp Allergy*, 20, 475-81.
- **Blanca M., Mayorga C., Sanchez F., Vega J.M., Fernandez J., Juarez C., Suau R. y Perez E. (1991).** Differences in serum IgE antibody activity to benzylpenicillin and amoxicillin measured by RAST in a group of penicillin allergic patients. *Allergy*, 46, 632-8.
- **Blanca M., Mayorga C., Perez E., Suau R., Juarez C., Vega J.M., Carmona M.J., Perez-Estrada M. y Garcia J. (1992).** Determination of IgE antibodies to the benzyl penicilloyl determinant. A comparison between poly-L-lysine and human serum albumin as carriers. *J Immunol Methods*, 153, 99-105.
- **Blanca M., Fernandez M., Moreno F., Pérez E., Mayorga C., Juarez C., García J. y Suau R. (1994a).** The nature of the carrier in the RAST assay influences the capacity for detecting IgE antibodies to penicillins. *J Clin Immunoassay*, 17, 160-170.
- **Blanca M., Vega J.M., Garcia J., Miranda A., Carmona M.J., Juarez C., Terrados S. y Fernandez J. (1994b).** New aspects of allergic reactions to betalactams: crossreactions and unique specificities. *Clin Exp Allergy*, 24, 407-15.
- **Blanca M. (1995).** Allergic reactions to penicillins. A changing world? *Allergy*, 50, 777-82.
- **Blanca M., Garcia J., Vega J.M., Miranda A., Carmona M.J., Mayorga C., Moreno F. y Juarez C. (1996).** Anaphylaxis to penicillins after non-therapeutic exposure: an immunological investigation. *Clin Exp Allergy*, 26, 335-40.
- **Blanca M., Torres M.J., Garcia J.J., Romano A., Mayorga C., de Ramon E., Vega J.M., Miranda A. y Juarez C. (1999).** Natural evolution of skin test sensitivity in patients allergic to beta-lactam antibiotics. *J Allergy Clin Immunol*, 103, 918-24.



- **Blanca M., Mayorga C., Torres M.J., Reche M., Moya M.C., Rodriguez J.L., Romano A. y Juarez C. (2001).** Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy*, 56, 862-70.
- **Blanca M., Mayorga C., Torres M.J., Warrington R., Romano A., Demoly P., Silviu-Dan F., Moya M., Fernandez J. y Juarez C. (2002).** Side chain specific reactions to betalactams: 14 years later. *Clin Exp Allergy*, 32, 192-7.
- **Blanca M., Romano A., Torres M.J., Demoly P. DeWeck A. (2007).** Continued need of appropriate betalactam-derived skin test reagents for the management of allergy to betalactams. *Clin Exp Allergy*, 37 (2), 166-73.
- **Blanca M., Romano A., Torres M.J., Fernandez J., Mayorga C., Rodriguez J., Demoly P., Bousquet P. J., Merk H. F., Sanz M. L., Ott H. y Atanaskovic-Markovic M. (2009).** Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams. *Allergy*, 64, 183-93.
- **Boguniewicz M. y Leung D.Y. (1995).** Hypersensitivity reactions to antibiotics commonly used in children. *Pediatr Infect Dis J*, 14, 221-31.
- **Bourdon E., Loreau N. y Blache D. (1999).** Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J*, 13, 233-44.
- **Bousquet P.J., Co-Minh H.B., Arnoux B., Daures J.P. y Demoly P. (2005).** Importance of mixture of minor determinants and benzylpenicilloyl poly-L-lysine skin testing in the diagnosis of beta-lactam allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 115, 1314-6.
- **Bousquet P.J., Pipet A., Bousquet-Rouanet L. y Demoly P. (2008).** Oral challenges are needed in the diagnosis of beta-lactam hypersensitivity. *Clin Exp Allergy*, 38, 185-90.
- **Brander C., Mauri-Hellweg D., Bettens F., Rolli H., Goldman M. y Pichler W.J. (1995).** Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals. *J Immunol*, 155, 2670-8.
- **Brandriss M.W., Smith J.W. y Steinman H.G. (1965).** Common Antigenic Determinants of Penicillin G, Cephalothin and 6-Aminopenicillanic Acid in Rabbits. *J Immunol*, 94, 696-704.
- **Brockow K., Romano A., Blanca M., Ring J., Pichler W. y Demoly P. (2002).** General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*, 57, 45-51.
- **Burkhart C., von Greyerz S., Depta J.P., Naisbitt D.J., Britschgi M., Park K.B. y Pichler W.J. (2001).** Influence of reduced glutathione on the proliferative response of

sulfamethoxazole-specific and sulfamethoxazole-metabolite-specific human CD4<sup>+</sup> T-cells. *Br J Pharmacol*, 132, 623-30.

- **Caffieri S., Miolo G., Seraglia R., Dalzoppo D., Toma F.M. y van Henegouwen G.M. (2007).** Photoaddition of fluphenazine to nucleophiles in peptides and proteins. Possible cause of immune side effects. *Chem Res Toxicol*, 20, 1470-6.

- **Cahen Y.D. y Wuthrich B. (1997).** Drug allergy to the beta-lactam antibiotics clavulanic acid and amoxicillin. *Allergy*, 52, 117-8.

- **Carey M.A. y van Pelt F.N. (2005).** Immunochemical detection of flucloxacillin adduct formation in livers of treated rats. *Toxicology*, 216, 41-8.

- **Carter D.C. y Ho J.X. (1994).** Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*, 45, 153-203.

- **Castrejon J.L., Berry N., El-Ghaiesh S., Gerber B., Pichler W.J., Park B.K. y Naisbitt D.J. (2010).** Stimulation of human T cells with sulfonamides and sulfonamide metabolites. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 411-418 e4.

- **Çelik G. et al. (2009).** Drug allergy. En: Middleton's Allergy, 7<sup>th</sup> ed.

- **Classen D.C., Pestotnik S.L., Evans R.S. y Burke J.P. (1991).** Computerized surveillance of adverse drug events in hospital patients. *JAMA*, 266, 2847-51.

- **Co Minh H.B., Bousquet P.J., Fontaine C., Kvedariene V. y Demoly P. (2006).** Systemic reactions during skin tests with beta-lactams: a risk factor analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 466-8.

- **Cribb A.E. y Spielberg S.S. (1993).** Sulphamethoxazole is metabolised to the hydroxylamine in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 51, 522-526.

- **Curry S., Mandelkow H., Brick P. y Franks N. (1998).** Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol*, 5, 827-35.

- **Curry S. (2002).** Beyond expansion: structural studies on the transport roles of human serum albumin. *Vox Sang*, 83 Suppl 1, 315-9.

- **Curry S. (2009).** Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24, 342-57.

- **Christie G., Coleman J.W. y Park B.K. (1988).** Drug-protein conjugates--XVII. The effect of storage on the antigenicity and immunogenicity of benzylpenicillin in the rat. *Biochem Pharmacol*, 37, 4121-8.

- **Christie G. y Park B.K. (1989).** Disposition and immunogenicity of penicillin in the rabbit. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 89, 162-8.

- **Chung W.H., Hung S.I., Hong H.S., Hsieh M.S., Yang L.C., Ho H.C., Wu J.Y. y Chen Y.T. (2004).** Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*, 428, 486.
- **Damaso D., Moreno-López M. y Daza R.M. (1984a).** Betalactaminas I. Penicilinas. In *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico*, ed. Grutesa, 119-168. Madrid.
- **Damaso D., Moreno-López M. y Daza R.M. (1984b).** Betalactaminas II. Cefalosporánidos. In *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico*, ed. Grutesa, 169-222. Madrid.
- **Davies R.J., Hendrick D.J. y Pepys J. (1974).** Asthma due to inhaled chemical agents: ampicillin, benzyl penicillin, 6 amino penicillanic acid and related substances. *Clin Allergy*, 4, 227-47.
- **de Haan P., de Jonge A.J., Verbrugge T. y Boorsma D.M. (1985).** Three epitope-specific monoclonal antibodies against the hapten penicillin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 76, 42-6.
- **de Haan P. y van Ketel W.G. (1987).** Specific reactions and cross reactions of anti-penicilloyl antibodies. *Allergy*, 42, 92-6.
- **de Weck A.L. (1962).** Studies on penicillin hypersensitivity. The specificity of rabbit "antipenicillin" antibodies. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 21, 20.
- **de Weck A.L. (1983a).** Immunopathological mechanisms and clinical aspects of allergy reactions to drugs. En: *Allergic reactions to drugs*, eds. A. L. de Weck & H. Bundgaard, 133. Berlin: Springer-Verlag.
- **de Weck, A.L. (1983b).** Penicillins and cephalosporins. En *Allergic reactions to drugs*, eds. A. L. de Weck & H. Bundgaard, 423-482. Berlin, Springer.
- **de Weck A., Sanz M.L., Gamboa P., Aberer W., Sturm G., Bilo M.B., Montroni M., Blanca M., Torres M.J., Mayorga C., Campi P., Manfredi M., Drouet M., Sainte-Laudy J., Romano A., Merk H., Weber J.M., Jermann T.M. y ENDA (2006).** Diagnosis of immediate-type betalactam allergy in vitro by flow-cytometry (FLOW-CAST) and sulfidoleukotriene production (CAST) a multicenter study. *Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Abstract book*, 196.
- **Dean R.T., Hunt J.V., Grant A.J., Yamamoto Y. y Niki E. (1991).** Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med*, 11, 161-8.
- **Demoly P. y Bousquet J. (2001).** Epidemiology of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 305-10.

- **Demoly P. y Hillaire-Buys D. (2004).** Classification and epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Immunol Allergy Clin North Am*, 24, 345-56, v.
- **Demoly P., Romano A., Botelho C., Bousquet-Rouanet L., Gaeta F., Silva R., Rumi G., Rodrigues Cernadas J. y Bousquet P.J. (2010).** Determining the negative predictive value of provocation tests with beta-lactams. *Allergy*, 65, 327-32.
- **Depta J. P., Altnauer F., Gernerding K., Burkhart C., Weltzien H.U. y Pichler W.J. (2004).** Drug interaction with T-cell receptors: T-cell receptor density determines degree of cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 519-27.
- **deShazo R.D. y Kemp S.F. (1997).** Allergic reactions to drugs and biologic agents. *JAMA*, 278, 1895-906.
- **Dessein A., Ju S.T., Dorf M.E., Benacerraf B. y Germain R.N. (1980).** IgE response to synthetic polypeptide antigens. II. Idiotypic analysis of the IgE response to L-glutamic acid<sub>60</sub>-L-alanine<sub>30</sub>-L-tyrosine<sub>10</sub> (GAT). *J Immunol*, 124, 71-6.
- **Dewdney J.M. (1977).** Immunology of the antibiotics. En: *The Antigens*, ed. M. Sela, 114-245. New York: Academic Press.
- **DiPiro J. T., Adkinson N.F. Jr. y Hamilton R.G. (1993).** Facilitation of penicillin haptentation to serum proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 1463-7.
- **Doña I., Blanca-Lopez N., Torres M.J., Garcia-Campos J., Garcia-Nunez I., Gomez F., M. Salas, Rondon C., Canto M.G. y Blanca M. (2012).** Drug hypersensitivity reactions: response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 22, 363-71.
- **Edwards I.R. y Aronson J.K. (2000).** Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*, 356, 1255-9.
- **Edwards R.G., Spackman D.A. y Dewdney J.M. (1982).** Development and use of three new radioallergosorbent tests in the diagnosis of penicillin allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 68, 352-7.
- **Edwards R.G., Dewdney J.M., Dobrzanski R.J. y Lee D. (1988).** Immunogenicity and allergenicity studies on two beta-lactam structures, a clavam, clavulanic acid, and a carbapenem: structure-activity relationships. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 85, 184-9.
- **Einarson T.R. (1993).** Drug-related hospital admissions. *Ann Pharmacother*, 27, 832-40.
- **Eisen H.N., Orris L. y Belman S. (1952).** Elicitation of delayed allergic skin reactions with haptens; the dependence of elicitation on hapten combination with protein. *J Exp Med*, 95, 473-87.

- **Elsheikh A., Lavergne S.N., Castrejon J.L., Farrell J., Wang H., Sathish J., Pichler W.J., Park B.K. y Naisbitt D.J. (2010).** Drug antigenicity, immunogenicity, and costimulatory signaling: evidence for formation of a functional antigen through immune cell metabolism. *J Immunol*, 185, 6448-60.
- **Evans T.W. (2002).** Review article: albumin as a drug biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther*, 16 Suppl 5, 6-11.
- **Farrell J., Naisbitt D.J., Drummond N.S., Depta J.P., Vilar F.J., Pirmohamed M. y Park B.K. (2003).** Characterization of sulfamethoxazole and sulfamethoxazole metabolite-specific T-cell responses in animals and humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 229-37.
- **Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S. y Ascenzi P. (2005).** The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57, 787-96.
- **Fattinger K., Roos M., Vergeres P., Holenstein C., Kind B., Masche U., Stocker D.N., Braunschweig S., Kullak-Ublick G.A., Galeazzi R.L., Follath F., Gasser T. y Meier P.J. (2000).** Epidemiology of drug exposure and adverse drug reactions in two swiss departments of internal medicine. *Br J Clin Pharmacol*, 49, 158-67.
- **Fernandez M., Warbrick E.V., Blanca M. y Coleman J.W. (1995).** Activation and hapten inhibition of mast cells sensitized with monoclonal IgE anti-penicillin antibodies: evidence for two-site recognition of the penicillin derived determinant. *Eur J Immunol*, 25, 2486-91.
- **Fernandez-Rivas M., Perez Carral C., Cuevas M., Marti C., Moral A. y Senent C.J. (1995).** Selective allergic reactions to clavulanic acid. *J Allergy Clin Immunol*, 95, 748-50.
- **Fernandez T.D., Torres M.J., Blanca-Lopez N., Rodriguez-Bada J.L., Gomez E., Canto G., Mayorga C. y Blanca M. (2009).** Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins. *Allergy*, 64, 242-8.
- **Finn M.J., Harris M.A., Hunt E. y Zomaya I.I. (1984).** Studies on the hydrolysis of clavulanic acid. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 3, 1345-1349.
- **Fujiwara K., Shin M., Miyazaki T. y Maruta Y. (2011).** Immunocytochemistry for amoxicillin and its use for studying uptake of the drug in the intestine, liver, and kidney of rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 62-71.
- **Fukushima H., Misaki R., Takeuchi M., Niinomi Y. y Harada M. (1987).** Mouse anti-benzylpenicilloyl IgE monoclonal antibody: preparation, characterization and cross-reactivity. *Clin Exp Immunol*, 68, 427-36.

- **Gadde J., Spence M., Wheeler B. y Adkinson N.F. Jr. (1993).** Clinical experience with penicillin skin testing in a large inner-city STD clinic. *JAMA*, 270, 2456-63.
- **Gamboa P.M., Garcia-Aviles M.C., Urrutia I., Antepara I., Esparza R. y Sanz M.L. (2004).** Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 14, 278-83.
- **Garcia J.J., Blanca M., Moreno F., Vega J.M., Mayorga C., Fernandez J., Juarez C., Romano A. y de Ramon E. (1997).** Determination of IgE antibodies to the benzylpenicilloyl determinant: a comparison of the sensitivity and specificity of three radio allerge sorbent test methods. *J Clin Lab Anal*, 11, 251-7.
- **Garman S.C., Wurzburg B.A., Tarchevskaya S.S., Kinet J.P. y Jardetzky T.S. (2000).** Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha. *Nature*, 406, 259-66.
- **Gayarre J., Stamatakis K., Renedo M. y Perez-Sala D. (2005).** Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett*, 579, 5803-8.
- **Geha R.S., Jabara H.H. y Brodeur S.R. (2003).** The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*, 3, 721-32.
- **Gell P.G.H. y Coombs R.R.A. (1963).** *Clinical aspects of immunology*. Oxford, U.K.: Blackwell.
- **Gill H.J., Hough S.J., Naisbitt D.J., Maggs J.L., Kitteringham N.R., Pirmohamed M. y Park B.K. (1997).** The relationship between the disposition and immunogenicity of sulfamethoxazole in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 282, 795-801.
- **Girard J.P. (1968).** Common antigenic determinants of penicillin G, ampicillin and the cephalosporins demonstrated in men. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 33, 428-38.
- **Girard J.P., Cattin S. y Cuevas M. (1976).** Immunological mechanisms and diagnostic tests in allergic drug reactions. *Ann Clin Res*, 8, 74-84.
- **Gomes E.R. y Demoly P. (2005).** Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5, 309-16.
- **Gonzalez de Olano D., Losada P.A., Caballer L., Vazquez Gonzalez A.C., Dieguez Pastor M.C. y Cuevas Agustin M. (2007).** Selective sensitization to clavulanic acid and penicillin V. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 17, 119-21.
- **Gonzalez Mancebo E., Cuevas M., Gonzalez E., Lara Catedra C. y Dolores Alonso M. (2002).** Simultaneous drug allergies. *Allergy*, 57, 963-4.

- **Gorevic P.D. y Levine B.B. (1981).** Desensitization of anaphylactic hypersensitivity specific for the penicilloate minor determinant of penicillin and carbenicillin. *J Allergy Clin Immunol*, 68, 267-72.
- **Gruchalla R.S. (2000).** Understanding drug allergies. *J Allergy Clin Immunol*, 105, S637-44.
- **Gruchalla R.S. (2003).** 10. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 111, S548-59.
- **Gueant J.L., Gueant-Rodriguez R.M., Viola M., Valluzzi R.L. y Romano A. (2006).** IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins. *Curr Pharm Des*, 12, 3335-45.
- **Guex y Peitsch (1997).** Electrophoresis, 18(15), 2714-2723.
- **Haddi E., Charpin D., Tafforeau M., Kulling G., Lanteaume A., Kleisbauer J.P. y Vervloet D. (1990).** Atopy and systemic reactions to drugs. *Allergy*, 45, 236-9.
- **Halliwell B. (1988).** Albumin an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol*, 37, 569-71.
- **Hamilton-Miller J.M. y Abraham E.P. (1971).** Specificities of haemagglutinating antibodies evoked by members of the cephalosporin C family and benzylpenicillin. *Biochem J*, 123, 183-90.
- **Harle D.G. y Baldo B.A. (1990).** Identification of penicillin allergenic determinants that bind IgE antibodies in the sera of subjects with penicillin allergy. *Mol Immunol*, 27, 1063-71.
- **Hashizume H., Takigawa M. y Tokura Y. (2002).** Characterization of drug-specific T cells in phenobarbital-induced eruption. *J Immunol*, 168, 5359-68.
- **Hoizey G., Lamiable D., Frances C., Trenque T., Kaltenbach M., Denis J. y Millart H. (2002).** Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal*, 30, 661-6.
- **Honma K., Nakamura M. y Ishikawa Y. (1991).** Acetylsalicylate-human serum albumin interaction as studied by NMR spectroscopy--antigenicity-producing mechanism of acetylsalicylic acid. *Mol Immunol*, 28, 107-13.
- **Hung S.I., Chung W.H., Liou L.B., Chu C.C., Lin M., Huang H.P., Lin Y.L., Lan J.L., Yang L.C., Hong H.S., Chen M.J., Lai P.C., Wu M.S., Chu C.Y., Wang K.H., Chen C.H., Fann C.S., Wu J.Y. y Chen Y.T. (2005).** HLA-B\*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4134-9.
- **Idsoe O., Guthe T., Willcox R.R. y de Weck A.L. (1968).** Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull World Health Organ*, 38, 159-88.

- **Iglesias J., Abernethy V.E., Wang Z., Lieberthal W., Koh J.S. y Levine J.S. (1999).** Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS. *Am J Physiol*, 277, F711-22.
- **Iio A., Waldmann T.A. y Strober W. (1978).** Metabolic study of human IgE: evidence for an extravascular catabolic pathway. *J Immunol*, 120, 1696-701.
- **Ishizaka K. y Ishizaka T. (1967).** Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*, 99, 1187-98.
- **Ito N., Yokomizo T., Sasaki T., Kurosu H., Penninger J., Kanaho Y., Katada T., Hanaoka K. y Shimizu T. (2002).** Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B<sub>4</sub>-induced enzyme release. *J Biol Chem*, 277, 44898-904.
- **Jaruga P., Zastawny T.H., Skokowski J., Dizdaroglu M. y Olinski R. (1994).** Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett*, 341, 59-64.
- **Jenkins R.E., Meng X., Elliott V.L., Kitteringham N.R., Pirmohamed M. y Park B.K. (2009).** Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo. *Proteomics Clin Appl*, 3, 720-9.
- **Kalish R.S. (1995).** Antigen processing: the gateway to the immune response. *J Am Acad Dermatol*, 32, 640-52.
- **Kamphof W.G., Rustemeyer T. y Bruynzeel D.P. (2002).** Sensitization to clavulanic acid in Augmentin. *Contact Dermatitis*, 47, 47.
- **Kano Y., Inaoka M. y Shiohara T. (2004).** Association between anticonvulsant hypersensitivity syndrome and human herpesvirus 6 reactivation and hypogammaglobulinemia. *Arch Dermatol*, 140, 183-8.
- **Karlberg A.T., Bergstrom M.A., Borje A., Luthman K. y Nilsson J.L. (2008).** Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem Res Toxicol*, 21, 53-69.
- **Kearns G.L., Wheeler J.G., Childress S.H. y Letzig L.G. (1994).** Serum sickness-like reactions to cefaclor: role of hepatic metabolism and individual susceptibility. *J Pediatr*, 125, 805-11.
- **Keller M., Lerch M., Britschgi M., Tache V., Gerber B.O., Luthi M., Lochmatter P., Kanny G., Bircher A.J., Christiansen C. y Pichler W.J. (2010).** Processing-dependent and -independent pathways for recognition of iodinated contrast media by specific human T cells. *Clin Exp Allergy*, 40, 257-68.



- **King C.L., Poindexter R.W., Ragunathan J., Fleisher T.A., Ottesen E.A. y Nutman T.B. (1991).** Frequency analysis of IgE-secreting B lymphocytes in persons with normal or elevated serum IgE levels. *J Immunol*, 146, 1478-83.
- **Kitteringham N.R., Maggs J.L., Newby S. y Park B.K. (1985).** Drug-protein conjugates--VIII. The metabolic fate of the dinitrophenyl hapten conjugated to albumin. *Biochem Pharmacol*, 34, 1763-71.
- **Klaus G.G.B. y Humphrey J.H. (1993).** The fate of antigens. En: *Clinical aspects of immunology*, eds. P. J. Lachmann, D. K. Peters, F. S. Rosen & M. J. Walport, 107-126. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- **Knol E.F., Koenderman L., Mul E., Verhoeven A.J. y Roos D. (1990).** Differential mechanisms in the stimulus-secretion coupling in human basophils: evidence for a protein-kinase-C-dependent and a protein-kinase-C-independent route. *Agents Actions*, 30, 49-52.
- **Knol E.F., Koenderman L., Mul F.P., Verhoeven A.J. y Roos D. (1991).** Differential activation of human basophils by anti-IgE and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Indications for protein kinase C-dependent and -independent activation pathways. *Eur J Immunol*, 21, 881-5.
- **Kormoczi G.F., Wolfel U.M., Rosenkranz A.R., Horl W.H., Oberbauer R. y Zlabinger G.J. (2001).** Serum proteins modified by neutrophil-derived oxidants as mediators of neutrophil stimulation. *J Immunol*, 167, 451-60.
- **Kraft D. y Wide L. (1976).** Clinical patterns and results of radioallergosorbent test (RAST) and skin tests in penicillin allergy. *Br J Dermatol*, 94, 593-601.
- **Kraft D., Roth A., Mischer P., Pichler H. y Ebner H. (1977).** Specific and total serum IgE measurements in the diagnosis of penicillin allergy. A long term follow-up study. *Clin Allergy*, 7, 21-8.
- **Kraft D., Berglund A., Rumpold H., Roth A. y Ebner H. (1981).** Radioallergosorbent test with conjugates specific for 'minor' haptenic determinants in the diagnosis of IgE-mediated penicillin allergy in man. *Clin Allergy*, 11, 579-87.
- **Kulczycki A. (1987).** The role of IgE. In *Allergy: An international Textbook*, 37-47. Wiley and Sons.
- **Lafaye P. y Lapresle C. (1987).** Location of penicilloyl groups on CNBr fragments of the albumin from penicillin-treated patients. *FEBS Lett*, 220, 206-8.
- **Lafaye P. y Lapresle C. (1988).** Fixation of penicilloyl groups to albumin and appearance of anti-penicilloyl antibodies in penicillin-treated patients. *J Clin Invest*, 82, 7-12.

- **Landsteiner K. y Jacobs J. (1935).** Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J Exp Med*, 61, 643-56.
- **Lang D.M., Alpern M.B., Visintainer P.F. y Smith S.T. (1991).** Increased risk for anaphylactoid reaction from contrast media in patients on beta-adrenergic blockers or with asthma. *Ann Intern Med*, 115, 270-6.
- **Lanzavecchia A. y Parodi B. (1984).** In vitro stimulation of IgE production at a single precursor level by human alloreactive T helper clones. *Clin Exp Immunol*, 55, 197-203.
- **Lavergne S.N., Park B.K. y Naisbitt D.J. (2008).** The roles of drug metabolism in the pathogenesis of T-cell-mediated drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 8, 299-307.
- **Lavergne S.N., Wang H., Callan H.E., Park B.K. y Naisbitt D.J. (2009).** "Danger" conditions increase sulfamethoxazole-protein adduct formation in human antigen-presenting cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 331, 372-81.
- **Lazarou J., Pomeranz B.H. y Corey P.N. (1998).** Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 279, 1200-5.
- **Lee C.E., Zembower T.R., Fotis M.A., Postelnick M.J., Greenberger P.A., Peterson L.R. y Noskin G.A. (2000).** The incidence of antimicrobial allergies in hospitalized patients: implications regarding prescribing patterns and emerging bacterial resistance. *Arch Intern Med*, 160, 2819-22.
- **Lee D., Dewdney J.M. y Edwards R.G. (1985).** The influence of hapten density on the assay of penicilloylated proteins in fluids. *J Immunol Methods*, 84, 235-43.
- **Lerch M. y Pichler W.J. (2004).** The immunological and clinical spectrum of delayed drug-induced exanthems. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4, 411-9.
- **Levine B.B. y Ovary Z. (1961).** Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D-alpha-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med*, 114, 875-904.
- **Levine B.B. (1962).** N(Alpha-D-Penicilloyl) Amines as Univalent Hapten Inhibitors of Antibodydependent Allergic Reactions to Penicillin. *J Med Pharm Chem*, 91, 1025-34.
- **Levine B.B. y Fellner M.J. (1965).** Immune responses to penicillin in man and penicillin allergy. *J Clin Invest*, 44, 1067.
- **Levine B.B. (1966).** Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. *N Engl J Med*, 275, 1115-25.

- **Levine B.B. y A.P. Redmond (1969).** Minor haptenic determinant-specific reagins of penicillin hypersensitivity in man. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 35, 445-55.
- **Levine B.B. (1976).** Immunochemical mechanism of drug allergy. En: *Textbook of immunopathology*, eds. P. A. Miescher & H. J. Muller-Ebhardt, 403-420. New York: Graeme and Stratton.
- **Lin E., Saxon A. y Riedl M. (2010).** Penicillin allergy: value of including amoxicillin as a determinant in penicillin skin testing. *Int Arch Allergy Immunol*, 152, 313-8.
- **Longo N., Gamboa P.M., Gastaminza G., Audicana M.T., Antepara I., Jauregui I. y Sanz M.L. (2008).** Diagnosis of clavulanic acid allergy using basophil activation and leukotriene release by basophils. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 18, 473-5.
- **Lusini L., Tripodi S.A., Rossi R., Giannerini F., Giustarini D., del Vecchio M.T., Barbanti G., Cintorino M., Tosi P. y Di Simplicio P. (2001).** Altered glutathione anti-oxidant metabolism during tumor progression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 91, 55-9.
- **Llins A., Vilanova B., Frau J., Muñoz F., Donoso J. y Page M.I. (1998).** Chemical reactivity of penicillins and cephalosporins. Intramolecular involvement of acyl-amido side chain. *J Org Chem*, 63, 9052-9060.
- **Macy E., Richter P.K., Falkoff R. y Zeiger R. (1997).** Skin testing with penicilloate and penilloate prepared by an improved method: amoxicillin oral challenge in patients with negative skin test responses to penicillin reagents. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 586-91.
- **Macy E., Goldberg B. y Poon K.Y. (2010).** Use of commercial anti-penicillin IgE fluorometric enzyme immunoassays to diagnose penicillin allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 105, 136-41.
- **Magi B., Marzocchi B., Bini L., Cellesi C., Rossolini A. y Pallini V. (1995).** Two-dimensional electrophoresis of human serum proteins modified by ampicillin during therapeutic treatment. *Electrophoresis*, 16, 1190-2.
- **Maizels N. (2003).** Yin outwits Yang at the IgE locus. *Nat Immunol*, 4, 7-8.
- **Maizels R.M. y Yazdanbakhsh M. (2003).** Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 3, 733-44.
- **Mallal S., Nolan D., Witt C., Masel G., Martin A.M., Moore C., Sayer D., Castley A., Mamotte C., Maxwell D., James I. y Christiansen F.T. (2002).** Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*, 359, 727-32.
- **Marshall W.F. y Blair J.E. (1999).** The cephalosporins. *Mayo Clin Proc*, 74, 187-95.

- **Matheu V., Perez-Rodriguez E., Sanchez-Machin I., de la Torre F. y Garcia-Robaina J.C. (2005).** Major and minor determinants are high-performance skin tests in beta-lactam allergy diagnosis. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 1167-8; author reply 1168-9.
- **Matzinger P. (1994).** Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045.
- **Mayorga C., Obispo T., Jimeno L., Blanca M., Moscoso del Prado J., Carreira J., Garcia J. J. y Juarez C. (1995).** Epitope mapping of beta-lactam antibiotics with the use of monoclonal antibodies. *Toxicology*, 97, 225-34.
- **Meekins C.V., Sullivan T.J. y Gruchalla R.S. (1994).** Immunochemical analysis of sulfonamide drug allergy: identification of sulfamethoxazole-substituted human serum proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 94, 1017-24.
- **Mendelson L.M., Ressler C., Rosen J.P. y Selcow J.E. (1984).** Routine elective penicillin allergy skin testing in children and adolescents: study of sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 73, 76-81.
- **Mendez C.M., McClain C.J. y Marsano L.S. (2005).** Albumin therapy in clinical practice. *Nutr Clin Pract*, 20, 314-20.
- **Meng X., Jenkins R.E., Berry N.G., Maggs J.L., Farrell J., Lane C.S., Stachulski A.V., French N.S., Naisbitt D.J., Pirmohamed M. y Park B.K. (2011).** Direct evidence for the formation of diastereoisomeric benzylpenicilloyl haptens from benzylpenicillin and benzylpenicillenic acid in patients. *J Pharmacol Exp Ther*, 338, 841-9.
- **Meyboom R.H., Lindquist M. y Egberts A.C. (2000).** An ABC of drug-related problems. *Drug Saf*, 22, 415-23.
- **Miranda A., Blanca M., Vega J.M., Moreno F., Carmona M.J., Garcia J.J., Segurado E., Justicia J.L. y Juarez C. (1996).** Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *J Allergy Clin Immunol*, 98, 671-7.
- **Miura K. y MacGlashan D.W. (2000).** Phosphatidylinositol-3 kinase regulates p21ras activation during IgE-mediated stimulation of human basophils. *Blood*, 96, 2199-205.
- **Mochizuki A., McEuen A.R., Buckley M.G. y Walls A.F. (2003).** The release of basogranulin in response to IgE-dependent and IgE-independent stimuli: validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation. *J Allergy Clin Immunol*, 112, 102-8.
- **Moller N.E., Nielsen B. y von Wurden K. (1990).** Changes in penicillin contamination and allergy in factory workers. *Contact Dermatitis*, 22, 106-7.

- **Montanaro S., Lhiaubet-Vallet V., Jimenez M.C., Blanca M. y Miranda M.A. (2009).** Photonucleophilic addition of the epsilon-amino group of lysine to a triflusal metabolite as a mechanistic key to photoallergy mediated by the parent drug. *ChemMedChem*, 4, 1196-202.
- **Montañez M.I., Perez-Inestrosa E., Suau R., Mayorga C., Torres M.J. y Blanca M. (2008).** Dendrimerized cellulose as a scaffold for artificial antigens with applications in drug allergy diagnosis. *Biomacromolecules*, 9, 1461-6.
- **Montañez, M.I., Nájera F. y Pérez-Inestrosa E. (2011).** NMR studies and molecular dynamic simulation of synthetic dendrimeric-antigens. *Polymers*, 3, 1533-53.
- **Monticelli S., De Monte L. y Vercelli D. (1998).** Molecular regulation of IgE switching: let's walk hand in hand. *Allergy*, 53, 6-8.
- **Moreno F., Blanca M., Mayorga C., Terrados S., Moya M., Perez E., Suau R., Vega J.M., Garcia J., Miranda A. et al. (1995).** Studies of the specificities of IgE antibodies found in sera from subjects with allergic reactions to penicillins. *Int Arch Allergy Immunol*, 108, 74-81.
- **Mozingo R. y Folkers G. (1949).** The chemistry of penicillins. En: *Princeton University*, 634-638. Nueva York, EEUU.
- **Nagakura N., Shimizu T., Masuzawa T. y Yanagihara Y. (1990).** Anti-cephalexin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to cepheems and penams. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 93, 126-32.
- **Nagakura N., Souma S., Shimizu T. y Yanagihara Y. (1991).** Anti-ampicillin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to various beta-lactams. *J Antimicrob Chemother*, 28, 357-68.
- **Naisbitt D. J., Britschgi M., Wong G., Farrell J., Depta J.P., Chadwick D.W., Pichler W.J., Pirmohamed M. y Park B.K. (2003a).** Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. *Mol Pharmacol*, 63, 732-41.
- **Naisbitt D.J., Farrell J., Wong G., Depta J.P., Dodd C.C., Hopkins J.E., Gibney C.A., Chadwick D.W., Pichler W.J., Pirmohamed M. y Park B.K. (2003b).** Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 1393-403.
- **Nassif A., Bensussan A., Dorothee G., Mami-Chouaib F., Bachot N., Bagot M., Boumsell L. y Roujeau J.C. (2002).** Drug specific cytotoxic T-cells in the skin lesions of a patient with toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol*, 118, 728-33.

- **Nassif A., Bensussan A., Boumsell L., Deniaud A., Moslehi H., Wolkenstein P., Bagot M. y Roujeau J.C. (2004).** Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug-specific cytotoxic T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 1209-15.
- **Navarro J., Obrador E., Carretero J., Petschen I., Avino J., Perez P. y Estrela J.M. (1999).** Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic Biol Med*, 26, 410-8.
- **Nebeker J.R., Barach P. y Samore M.H. (2004).** Clarifying adverse drug events: a clinician's guide to terminology, documentation, and reporting. *Ann Intern Med*, 140, 795-801.
- **Neu H.C., Wilson A.P.R. y Gruneberg R.N. (1993).** Amoxicillin-clavulanic acid: a review of its efficacy in over 38500 patients from 1979 to 1992. *J Chemotherapy*, 2, 67-93.
- **Nishida K., Kinoshita Y., Atsumi T., Shibata K. y Horiuchi Y. (1972).** The analysis of combining sites of rabbit anti-benzylpenicilloyl antibodies. *Immunochemistry*, 9, 1195-202.
- **O'Donnell C.A., Foster A.L. y Coleman J.W. (1991).** Penicillamine and penicillin can generate antigenic determinants on rat peritoneal cells in vitro. *Immunology*, 72, 571-576.
- **Oettl K. y R.E. Stauber (2007).** Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*, 151, 580-90.
- **Olivier P., Boulbes O., Tubery M., Lauque D., Montastruc J.L. y Lapeyre-Mestre M. (2002).** Assessing the feasibility of using an adverse drug reaction preventability scale in clinical practice: a study in a French emergency department. *Drug Saf*, 25, 1035-44.
- **Padial M.A., Alvarez-Ferreira J., Tapia B., Blanco R., Manas C., Blanca M. y Bellon T. (2004).** Acute generalized exanthematous pustulosis associated with pseudoephedrine. *Br J Dermatol*, 150, 139-42.
- **Padilla Serrato M.T., Arias Cruz A., Weinmann A., Gonzalez Diaz S.N., Galindo Rodriguez G. y Garcia Cobas C.Y. (2006).** Prevalence of allergy to drugs in a group of asthmatic children and adolescents of northeast of Mexico. *Rev Alerg Mex*, 53, 179-82.
- **Padovan E., Mauri-Hellweg D., Pichler W.J. y Weltzien H.U. (1996).** T cell recognition of penicillin G: structural features determining antigenic specificity. *Eur J Immunol*, 26, 42-8.

- **Padovan E., Bauer T., Tongio M.M., Kalbacher H. y Weltzien H.U. (1997).** Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy. *Eur J Immunol*, 27, 1303-7.
- **Park B.K., Coleman J.W. y Kitteringham N.R. (1987).** Drug disposition and drug hypersensitivity. *Biochem Pharmacol*, 36, 581-90.
- **Park B.K. y Kitteringham N.R. (1990).** Drug-protein conjugation and its immunological consequences. *Drug Metab Rev*, 22, 87-144.
- **Park B.K., Pirmohamed M. y Kitteringham N.R. (1998).** Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. *Chem Res Toxicol*, 11, 969-88.
- **Parker C.W., Deweck A.L., Kern M. y Eisen H.N. (1962).** The preparation and some properties of penicillenic acid derivatives relevant to penicillin hypersensitivity. *J Exp Med*, 115, 803-19.
- **Parker C.W. (1980).** Drug allergy. En: *Clinical immunology*, ed. C. W. Parker, 1219-1260. Philadelphia: Saunders.
- **Patterson R., Suszko I.M., Hsu C.C., Roberts M. y Oh S.H. (1975).** In vitro production of IgE by lymphocytes from a patient with hyperimmunoglobulinaemia E, eosinophilia and increased lymphocytes carrying surface IgE. *Clin Exp Immunol*, 20, 265-72.
- **Patterson R., DeSwarte R.D., Greenberger P.A., Grammer L.C., Brown J.E. y Choy A.C. (1995).** *Drug allergy and protocols for management of drug allergies*, 2nd ed.: Oceanside Publications.
- **Peters T. (1996).** *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. San Diego and London: Academic Press.
- **Petri M. y Allbritton J. (1992).** Antibiotic allergy in systemic lupus erythematosus: a case-control study. *J Rheumatol*, 19, 265-9.
- **Phol L.R., Satoh H., Christ D.D. y Kenna J.G. (1988).** The immunologic and metabolic basis of drug hypersensitivities. *Ann Rev Pharmacol*, 28, 367.
- **Pichler W.J., Schnyder B., Zanni M.P., Hari Y. y von Greyerz S. (1998).** Role of T cells in drug allergies. *Allergy*, 53, 225-32.
- **Pichler W.J. (2002).** Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2, 301-5.
- **Pichler W.J. (2003).** Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med*, 139, 683-93.

- **Pirmohamed M., Kitteringham N.R. y Park B.K. (1994).** The role of active metabolites in drug toxicity. *Drug Saf*, 11, 114-44.
- **Pirmohamed M. y Park B.K. (1996).** Cytochromes P450 and Immunotoxicity. In *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, ed. C. Ioannides, 329-354.
- **Pirmohamed M., James S., Meakin S., Green C., Scott A.K., Walley T.J., Farrar K., Park B.K. y Breckenridge A.M. (2004).** Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*, 329, 15-9.
- **Ponvert C., Weilenmann C., Wassenberg J., Walecki P., Bourgeois M.L., de Blic J. y Scheinmann P. (2007).** Allergy to betalactam antibiotics in children: a prospective follow-up study in retreated children after negative responses in skin and challenge tests. *Allergy*, 62, 42-6.
- **Posadas S., Juarez C., Torres M.J., de la Fuente J., García J.J. y Blanca M. (1997).** Seguimiento de los valores del RAST en sujetos con anticuerpos IgE específicos a beta-lactámicos. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*, 12, 7-8.
- **Pouyanne P., Haramburu F., Imbs J.L. y Begaud B. (2000).** Admissions to hospital caused by adverse drug reactions: cross sectional incidence study. French Pharmacovigilance Centres. *BMJ*, 320, 1036.
- **Prakash K.R., Tang Y., Kozikowski A.P., Flippen-Anderson J.L., Knoblach S.M. y Faden A.I. (2002).** Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorg Med Chem*, 10, 3043-8.
- **Puche Cañas E. y Luna Jde D. (2006).** Adverse drug reactions: an update review of the problem in Spain. *Rev Clin Esp*, 206.
- **Rademaker M., Oakley A. y Duffill M.B. (1995).** Cutaneous adverse drug reactions in a hospital setting. *N Z Med J*, 108, 165-6.
- **Raison-Peyron N., Messaad D., Bousquet J. y Demoly P. (2003).** Selective immediate hypersensitivity to clavulanic acid. *Ann Pharmacother*, 37, 1146-7.
- **Rawlins M.D. y Thompson J.W. (1977).** *Pathogenesis of adverse drug reactions*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- **Riedl M.A. y Casillas A.M. (2003).** Adverse drug reactions: types and treatment options. *Am Fam Physician*, 68, 1781-90.
- **Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E. y Bourdon E. (2008).** The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, 582, 1783-7.
- **Rodriguez-Bada J.L., Montanez M.I., Torres M.J., Mayorga C., Canto G., Perez-Inestrosa E., Suau R. y Blanca M. (2006).** Skin testing for immediate hypersensitivity to betalactams: comparison between two commercial kits. *Allergy*, 61, 947-51.



- **Romano A., Blanca M., Mayorga C., Venuti A. y Gasbarrini G. (1997a).** Immediate hypersensitivity to penicillins. Studies on Italian subjects. *Allergy*, 52, 89-93.
- **Romano A., Torres M.J., Fernandez J., Vega J.M., Mayorga C., Garcia J. y Blanca M. (1997b).** Allergic reactions to ampicillin. Studies on the specificity and selectivity in subjects with immediate reactions. *Clin Exp Allergy*, 27, 1425-31.
- **Romano A., Mayorga C., Torres M.J., Artesani M.C., Suau R., Sanchez F., Perez E., Venuti A. y Blanca M. (2000).** Immediate allergic reactions to cephalosporins: cross-reactivity and selective responses. *J Allergy Clin Immunol*, 106, 1177-83.
- **Romano A., Blanca M., Torres M.J., Bircher A., Aberer W., Brockow K., Pichler W.J. y Demoly P. (2004).** Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy*, 59, 1153-60.
- **Romano A., Gueant-Rodriguez R.M., Viola M., Amoghly F., Gaeta F., Nicolas J.P. y Gueant J.L. (2005).** Diagnosing immediate reactions to cephalosporins. *Clin Exp Allergy*, 35, 1234-42.
- **Romano A. y Demoly P. (2007).** Recent advances in the diagnosis of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 7, 299-303.
- **Romano A., Viola M., Bousquet P.J., Gaeta F., Valluzzi R., Caruso C. y Demoly P. (2007).** A comparison of the performance of two penicillin reagent kits in the diagnosis of beta-lactam hypersensitivity. *Allergy*, 62, 53-8.
- **Romano A., Bousquet-Rouanet L., Viola M., Gaeta F., Demoly P. y Bousquet P.J. (2009).** Benzylpenicillin skin testing is still important in diagnosing immediate hypersensitivity reactions to penicillins. *Allergy*, 64, 249-53.
- **Romano A., Torres M.J., Castells M., Sanz M.L. y Blanca M. (2011).** Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 127, S67-73.
- **Ross S.D. (2001).** Drug-related adverse events: a readers' guide to assessing literature reviews and meta-analyses. *Arch Intern Med*, 161, 1041-6.
- **Rubin B. (1972).** Studies on the induction of antibody synthesis against sulfanilic acid in rabbits. I. Effect of the number of hapten molecules introduced in homologous protein on antibody synthesis against the hapten and the new antigenic determinants. *Eur J Immunol*, 2, 5-11.
- **Rubio M., Bousquet P.J., Gomes E., Romano A. y Demoly P. (2012).** Results of drug hypersensitivity evaluations in a large group of children and adults. *Clin Exp Allergy*, 42, 123-30.
- **Ruiz-Sanchez A. J., Montañez M.I., Mayorga C., Torres M.J., Kehr N.S., Vida Y., Collado D., Najera F., De Cola L. y Perez-Inestrosa E. (2012).** Dendrimer-modified solid

supports: nanostructured materials with potential drug allergy diagnostic applications. *Curr Med Chem*, 19, 4942-54.

- **Sabath L.D. (1984).** Biochemical and physiologic basis for susceptibility and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial agents. *Rev Infect Dis*, 6 Suppl 3, S643-56.

- **Sampson H.A., Munoz-Furlong A., Campbell R.L., Adkinson N.F. Jr., Bock S.A., Branum A., Brown S.G., Camargo C.A. Jr., Cydulka R., Galli S.J., Gidudu J., Gruchalla R.S., Harlor A.D. Jr., Hepner D.L., Lewis L.M., Lieberman P.L., Metcalfe D.D., O'Connor R., Muraro A., Rudman A., Schmitt C., Scherrer D., Simons F.E., Thomas S., Wood J.P. y Decker W.W. (2006).** Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 391-7.

- **Sanchez-Borges M. y Capriles-Hulett A. (2000).** Atopy is a risk factor for non-steroidal anti-inflammatory drug sensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 84, 101-6.

- **Sanchez-Morillas L., Perez-Ezquerro P.R., Reano-Martos M., Laguna-Martinez J.J., Sanz M.L. y Martinez L.M. (2010).** Selective allergic reactions to clavulanic acid: a report of 9 cases. *J Allergy Clin Immunol*, 126, 177-9.

- **Sanz M.L., Gamboa P.M., Antepara I., Uasuf C., Vila L., Garcia-Aviles C., Chazot M. y De Weck A.L. (2002).** Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy*, 32, 277-86.

- **Sastre J., Manso L., Sanchez-Garcia S. y Fernandez-Nieto M. (2012).** Medical and economic impact of misdiagnosis of drug hypersensitivity in hospitalized patients. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 566-7.

- **Schevchenko A., Tomasa H., Havlis J., Olsen J.V. y Mann M. (2006).** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1, 2856-60.

- **Schnyder B., Mauri-Hellweg D., Zanni M., Bettens F. y Pichler W.J. (1997).** Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones. *J Clin Invest*, 100, 136-41.

- **Schnyder B., Burkhart C., Schnyder-Frutig K., von Greyerz S., Naisbitt D.J., Pirmohamed M., Park B.K. y Pichler W.J. (2000).** Recognition of sulfamethoxazole and its reactive metabolites by drug-specific CD4+ T cells from allergic individuals. *J Immunol*, 164, 6647-54.

- **Serrano J., Hita J., Ponferrada C., López M. y Cárceles C. (1989).** Intravenous pharmacokinetics and binding to plasmatic proteins of amoxicillin and clavulanic acid in sheeps. *AN VET*, 5, 75-87.
- **Shimizu T., Souma S., Nagakura N., Masuzawa T., Iwamoto Y. y Yanagihara Y. (1992).** Epitope analysis of aztreonam by antiaztreonam monoclonal antibodies and possible consequences in beta-lactams hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol*, 98, 392-7.
- **Shmunis E. (1977).** Occult penicillin exposure reaction. *Ann Allergy*, 39, 186-8.
- **Silviu-Dan F., McPhillips S. y Warrington R.J. (1993).** The frequency of skin test reactions to side-chain penicillin determinants. *J Allergy Clin Immunol*, 91, 694-701.
- **Siraganian R.P. (1988).** Mechanism of IgE-mediated hypersensitivity. In *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, eds. E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Elliot, N. F. Adkinson & J. W. Yunginger, 105-134. Mosby: St. Louis.
- **Sitjar Martinez de Sas S. y Sacanella Mesenguer E. (1999).** Introducción y epidemiología de las reacciones adversas a medicamentos (RAM). *JANO*, 1320, 42-47.
- **Smith C.C., Bennett P.M., Pearce H.M., Harrison P.I., Reynolds D.J., Aronson J.K. y Grahame-Smith D.G. (1996).** Adverse drug reactions in a hospital general medical unit meriting notification to the Committee on Safety of Medicines. *Br J Clin Pharmacol*, 42, 423-9.
- **Smurthwaite L. y Durham S.R. (2002).** Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2, 231-8.
- **Sudlow G., Birkett D.J. y Wade D.N. (1975).** Spectroscopic techniques in the study of protein binding. A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2, 129-40.
- **Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M. y Kobayashi K. (1999).** Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*, 12, 439-46.
- **Sullivan T.J., Wedner H.J., Shatz G.S., Yecies L.D. y Parker C.W. (1981).** Skin testing to detect penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 68, 171-80.
- **Sullivan T.J. (1988).** Drug allergy. En: *Allergy. Principles and Practice*, eds. E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Elliot, N. F. Adkinson & J. W. Yunginger, 1726-1746. St Louis: Mosby.
- **Sutton B. J. y H.J. Gould (1993).** The human IgE network. *Nature*, 366, 421-8.
- **Szczeklik A., Nizankowska-Mogilnicka E. y Sanak M. (2009).** Hypersensitivity to aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. 7th edition. En: *Middleton's Allergy*.

*Principles & Practice*, eds. N. F. Adkinson, B. S. Brochner, W. W. Busse, S. T. Holgate & R. F. Lemanske, 1127-1243. Philadelphia: Mosby.

- **Tedeschi A., Lorini M., Galbiati S., Gibelli S. y Miadonna A. (2000).** Inhibition of basophil histamine release by tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Int J Immunopharmacol*, 22, 797-808.

- **Thong B.Y., Leong K.P., Tang C.Y. y Chang H.H. (2003).** Drug allergy in a general hospital: Results of a novel prospective inpatient reporting system. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 90, 342-7.

- **Torres M.J., Romano A., Mayorga C., Moya M.C., Guzman A.E., Reche M., Juarez C. y Blanca M. (2001).** Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing. *Allergy*, 56, 850-6.

- **Torres M.J., Mayorga C., Cornejo-Garcia J.A., Romano A. y Blanca M. (2002).** IgE antibodies to penicillin in skin test negative patients. *Allergy*, 57, 965.

- **Torres M.J., Blanca M., Fernandez J., Romano A., Weck A., Aberer W., Brockow K., Pichler W.J. y Demoly P. (2003).** Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy*, 58, 961-72.

- **Torres M.J., Padial A., Mayorga C., Fernandez T., Sanchez-Sabate E., Cornejo-Garcia J.A., Antunez C. y Blanca M. (2004).** The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy*, 34, 1768-75.

- **Torres M.J. y Blanca M. (2006a).** The contribution of major and minor determinants from benzylpenicillin to the diagnosis of immediate allergy to beta-lactams. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 220-1; author reply 221.

- **Torres M.J. y Blanca M. (2006b).** Importance of skin testing with major and minor determinants of benzylpenicillin in the diagnosis of allergy to betalactams. Statement from the European Network for Drug Allergy concerning AllergoPen withdrawal. *Allergy*, 61, 910-1.

- **Torres M. J. y M. Blanca (2010).** The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams. *Med Clin North Am*, 94, 805-20, xii.

- **Tortajada Girbes M., Ferrer Franco A., Gracia Antequera M., Clement Paredes A., Garcia Munoz E. y Tallon Guerola M. (2008).** Hypersensitivity to clavulanic acid in children. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 36, 308-10.

- **Tsuji A., Yamana T., Miyamoto E. y Kiya E. (1975).** Chemical reactions involved in penicillin allergy: kinetics and mechanism of penicillin aminolysis. *J Pharm Pharmacol*, 27, 580-7.
- **Van Dellen R.G., Walsh W.E., Peters G.A. y Gleich G.J. (1971).** Differing patterns of wheal and flare skin reactivity in patients allergic to the penicillins. *J Allergy*, 47, 230-6.
- **Van der Vusse G.J. (2009).** Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24, 300-307.
- **Varshney A., Sen P., Ahmad E., Rehan M., Subbarao N. y Khan R.H. (2010).** Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? *Chirality*, 22, 77-87.
- **Vercelli D. (2009).** Immunology of IgE. En: *Middleton's Allergy, 7th Edition*, eds. N. F. Adkinson, B. S. Brochner, W. W. Busse, S. T. Holgate, R. F. Lemanske & F. E. Simons. Elsevier.
- **Vervloet D., Pradal M., Charpin D. y Porri F. (1995).** Diagnosis of drug allergic reactions. *Clin Rev Allergy Immunol*, 13, 265-80.
- **Vervloet D. y Durham S. (1998).** Adverse reactions to drugs. *BMJ*, 316, 1511-4.
- **Warbrick E.V., Thomas A.L., Stejskal V. y Coleman J.W. (1995).** An analysis of beta-lactam-derived antigens on spleen cell and serum proteins by ELISA and Western blotting. *Allergy*, 50, 910-7.
- **Warrington R.J., Silviu-Dan F. y Magro C. (1993).** Accelerated cell-mediated immune reactions in penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 92, 626-8.
- **Watanabe H., Grimsley G., Major G.A. y Dawkins R.L. (1986).** Increased binding of D-penicillamine to monocytes in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*, 39, 173-8.
- **Watanabe H., Kelly H. y Dawkins R.L. (1987).** Association of HLA DR1 with high D-penicillamine binding to monocytes in females. *Microbiol Immunol*, 31, 83-8.
- **Weber D.J., Tolkoff-Rubin N.E. y Rubin R.H. (1984).** Amoxicillin and potassium clavulanate: an antibiotic combination. Mechanism of action, pharmacokinetics, antimicrobial spectrum, clinical efficacy and adverse effects. *Pharmacotherapy*, 4, 122-36.
- **Weiss M.E. y Adkinson N.F. (1988).** Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. *Clin Allergy*, 18, 515-40.
- **West I.C. (2000).** Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*, 17, 171-80.

- **Whitaker P., Meng X., Laverne S.N., El-Ghaiesh S., Monshi M., Earnshaw C., Peckham D., Gooi J., Conway S., Pirmohamed M., Jenkins R.E., Naisbitt D.J. y Park B.K. (2011).** Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*, 187, 200-11.
- **Wide L. (1969).** Radioimmunoassays employing immunosorbents. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 142, 207-21.
- **Wide L. y Juhlin L. (1971).** Detection of penicillin allergy of the immediate type by radioimmunoassay of reagins (IgE) to penicilloyl conjugates. *Clin Allergy*, 1, 171-7.
- **Wilson R.A. (1991).** The liver: its role in drug biotransformation and as a target of immunologic injury. *Immunol Allergy Clin North Am*, 11, 555.
- **Yamaguchi S., Aldini G., Ito S., Morishita N., Shibata T., Vistoli G., Carini M. y Uchida K. (2010).** Delta12-prostaglandin J2 as a product and ligand of human serum albumin: formation of an unusual covalent adduct at His146. *J Am Chem Soc*, 132, 824-32.
- **Yazdanbakhsh M., van den Biggelaar A. y Maizels R.M. (2001).** Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol*, 22, 372-7.
- **Yvon M. y Wal J.M. (1988).** Identification of lysine residue 199 of human serum albumin as a binding site for benzylpenicilloyl groups. *FEBS Lett*, 239, 237-40.
- **Yvon M., Anglade P. y Wal J.M. (1989).** Binding of benzyl penicilloyl to human serum albumin. Evidence for a highly reactive region at the junction of domains 1 and 2 of the albumin molecule. *FEBS Lett*, 247, 273-8.
- **Yvon M., Anglade P. y Wal J.M. (1990).** Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of penicillin, on the serum albumin molecule. *FEBS Lett*, 263, 237-40.
- **Zhao Z., Batley M., D'Ambrosio C. y Baldo B.A. (2000).** In vitro reactivity of penicilloyl and penicillanyl albumin and polylysine conjugates with IgE-antibody. *J Immunol Methods*, 242, 43-51.

